

PAPER DETAILS

TITLE: Preparatif HPLC Yöntemiyle Yüksek Saflikta Alfa Amanitin Saflastirilmesi

AUTHORS: Kaya E

PAGES: 35-41

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/107997>

ARAŞTIRMA

Ertuğrul Kaya¹
Selim Karahan¹
Kürşat Oğuz Yaykaşlı²
Recep Bayram³
Ayhan Sarıtaş⁴

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

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

³Abant İzzet Baysal
Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim
Dalı, Bolu.

⁴Düzce Üniversitesi, Tıp
Fakültesi Acil Tıp Anabilim
Dalı, Düzce.

İletişim Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul Kaya
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji AD,
81620 Düzce.
Tel: 0380 5421416
E-mail: drekaya@yahoo.com

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

Preparatif HPLC Yöntemiyle Yüksek Safılıkta Alfa Amanitin Safılaştırılması

ÖZET

Amaç: Alfa amanitin mevcut yöntemlerle ancak %90 civarında saflık oranında saflaştırılabilmektedir. Bu araştırmada yüksek saflıkta alfa amanitin elde etmek için preparatif HPLC kullanılarak uygulanan yöntemin tanımlanması amaçlanmıştır.

Metod: *Amanita phalloides* mantarları toplandı, ekstrakte edildi, 2 defa preparatif HPLC ile saflaştırma işlemi uygulandı. Toksinin doğrulaması analitik HPLC’deki tutulma zamanı ve ultraviyole spektrumu karşılaştırılması yöntemleriyle yapıldı.

Bulgular: 1. saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen alfa amanitin saflık oranı %93 ($\pm 1,24$) olarak bulundu. 2. saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen alfa amanitin saflık oranı %99,8 ($\pm 0,26$) olarak bulundu. Elde edilen toksin ile standardın UV spektrumlarında her ikisinde de 303 nm’de maksimum, 263 nm’de minimum absorbans verdiği ve spektrum yapısının aynı olduğu görüldü.

Sonuç: Tanımladığımız bu yöntemle, >%99 saflıkta alfa amanitin uygun maliyetle elde edilmesi mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Alfa amanitin, Preparatif HPLC, Saflaştırma

Purification of High Purity Alpha Amanitin Using Preparative HPLC Method

ABSTRACT

Objective: Alpha-amanitin is purified only around 90% purity using existing methods. In this study, it was aimed to describe the method in order to obtain high-purity alpha-amanitin using preparative HPLC.

Methods: *Amanita phalloides* mushroom was collected, extracted and purified 2 times using preparative HPLC. Validation of the toxin was performed by comparison of retention time and ultraviolet spectrum at HPLC.

Results: Alpha-amanitin was obtained with 93% (± 1.24) purity after first purification process. Alpha-amanitin was obtained with 99,8% (± 0.26) purity after second purification process. It was 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: Alpha-amanitin with >99% purity can be obtained by this method at low cost.

Keywords: Alpha amanitin, Preparative HPLC, Purification

GİRİŞ

Dünyada yaklaşık olarak 5000 dolayında mantar sınıflandırılmış olup, bunlardan 100 dolayında türün zehirli olduğu tespit edilmiştir. Bunlar arasında yaklaşık 10 türün ölümcül zehirlenmelere neden olduğu bilinmektedir (1). Zehirli mantarlar farklı bazı tanımlanmış toksinleri içerirler ve bu toksinlere göre klinik tablo değişiklik gösterir. Dünyada tüm acil vakaların yaklaşık %2,5-7'sinin, ülkemizde ise %0,5-3'ünün mantar zehirlenmesi vakası olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda kültür mantarı üretiminin artması, çeşitli türlerin kültür ortamında üretilmesi, zehirlenmelerin halk arasında duyulması gibi nedenlerle mantar zehirlenmesi vakalarının azaldığı görülmektedir (2). Zehirli mantarların bol yetiştiği bazı yıllarda zehirlenme vakalarında artış olduğu bilinmektedir (3).

Zehirli mantarlar arasında en iyi bilineni *Amanita phalloides* türüdür. Tüm 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 oluştuğundan siklopeptidler olarak da bilinirler. Yapı içindeki sisteinde bulunan sülfür atomu diğer aminoasitlerden triptofanın indolamin grubu ile bağ yaparak yapıyı bisiklik hale getirir. Ana yapının substitülerindeki değişiklikler sonucu farklı toksinlerin de mantar içinde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu toksinler ve genel yapı 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 eder. 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).

Alfa amanitin deneysel araştırmalarda daha çok RNA polimeraz II inhibisyonu için kullanılmaktadır, bu amaçla en sık kullanılan

ajandır (6). Ayrıca *Amanita phalloides* mantar zehirlenmesini modellemek amacıyla da hücre kültürü ve hayvan modellerinde kullanılmaktadır (8-9). Alfa amanitin araştırılarda kullanılmak üzere >%90 saflıkta 1 mg'lık viyallerde birkaç firma tarafından ticari olarak satılmaktadır. Alfa amanitin saflaştırılması için sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve sonrasında kolon kromatografisini içeren bir yöntem önceden tanımlanmıştır. Alfa amanitin, bu toksini içeren her mantardan saflaştırılabilir, en bol yetişen *Amanita phalloides* mantarı bu amaçla tercih edilmektedir (10). Son yıllarda HPLC kullanımının artması ve veriminin iyi olması nedeniyle bu yöntemle alfa amanitin ve diğer toksinlerin analiz yöntemleri geliştirilmiştir (11).

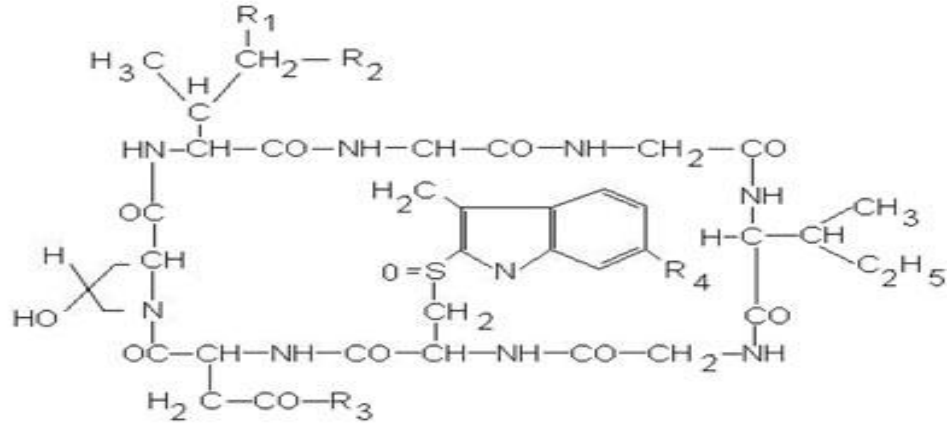
HPLC analiz yönteminin farklı bir versiyonu olan preparatif sistemde, analiz edilen materyal yüksek saflıkta elde edilebilmektedir. Bu yöntemde kolon kapasitesi ve mobil faz akış hızı artırılmakta, sisteme yüksek miktarda numune yüklenmekte, bu sayede bol miktarda analit saflaştırılabilmektedir. Ancak sıvı-sıvı ekstraksiyonuna göre daha pahalı ve zor olan bu yöntem, diğer yöntemlerle yüksek verim alınamayan maddelerin saflaştırılmasında daha kullanışlı olmaktadır (12).

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

MATERYAL ve METOD

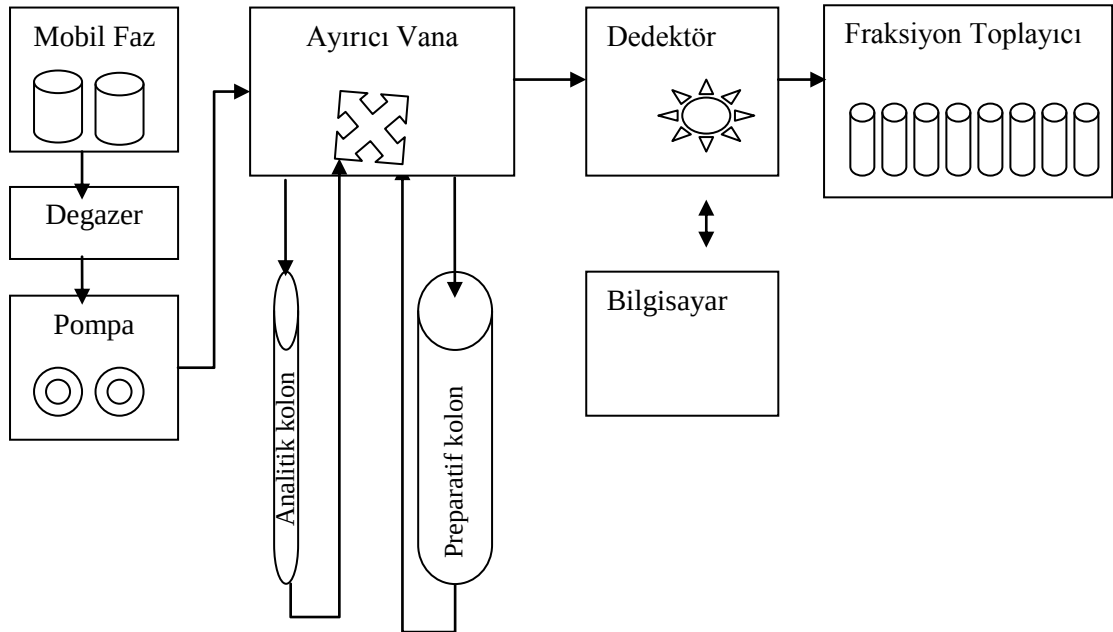
HPLC analizlerindeki tüm çözücüler analitik grade kullanıldı. Alfa amanitin standardı Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edildi. Mantarlar toplandı, ekstrakte edildi, 2 defa preparatif HPLC saflaştırma işlemi uygulandı. Her bir aşamadan sonra saflık oranları ölçüldü. Toksinin doğrulaması analitik HPLC'deki tutulma zamanı ve ultraviyole (UV) spektrumu karşılaştırılması yöntemleriyle yapıldı. İşlem 6 defa tekrarlanarak, sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak verildi.

Mantar ekstraksiyonu: *Amanita phalloides* mantarları 16.11.2011 tarihinde Düzce/Gümüşova/Yeşilyayla Kasabası ormanlık alanından toplandı. Mantarların tanımlaması mikroskopik ve makroskopik özelliklerine göre yapıldı (1). Mantarlar 50-60 °C hava akımı altında 12 saatte kurutuldu, öğütülerek toz haline getirildi. 10 gramlık materyal, 6 ayrı sokslet filtresi içine alındı, 6 farklı kanalda 150 mL %50 metanolde 4 saat sokslet aparatında ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen ekstraktlar vakum evaporatörde tam kuruluğa kadar 50 °C de buharlaştırıldı. Kalan materyal üzerine 1. mobil fazdan 10 mL eklenerek iyice çözüldü, 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı kısım alındı, 45 µm filtreden geçirilerek preparatif HPLC sistemine 1 mL enjekte edildi.



		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
α	Amanitin	-OH	-OH	-NH ₂	-OH
β	Amanitin	-OH	-OH	-OH	-OH
γ	Amanitin	-OH	-H	-NH ₂	-OH
δ	Amanitin	-OH	-H	-OH	-OH

Şekil 1. Amanitin grubu toksinlerin moleküler yapısı



Şekil 2. Kullanılan HPLC sisteminin şematik görünümü

Preparatif HPLC Sistemi: Aynı degazer, pompa ve dedektör 2 farklı paralel hatta bağlanarak bir vana yoluyla hem preparatif hem analitik HPLC sistemleri oluşturuldu (Şekil 2). 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 kullanıldı. Mobil faz akış hızı 16 mL/dakika izokratik olarak kullanıldı. 1. mobil faz olarak amonyum asetat (50 mM, pH 5,5 asetik asit), asetonitril, metanol (80:10:10, v/v/v) kullanıldı. Öncelikle alfa amanitin standardı 100ug/mL bu sisteme uygulandı ve tutulma zamanı ile toksinin UV spektrumu kaydedildi. Hazırlanmış olan *Amanita phalloides* ekstresi bu sisteme 1 mL uygulandı. Alfa amanitin standardı ile aynı tutulma zamanında gelen pik başlangıcından sonuna kadar fraksiyon toplayıcı ile toplandı (Şekil 3). Fraksiyonun saflık oranı ölçüldü. Elde edilen fraksiyon vakum evaporatörde 50 °C de kurutuldu, 1 mL %40 metanolde çözülür ve 2. saflaştırma için yeniden preparatif HPLC sistemine uygulandı. 2. preparatif HPLC işlemi, saflık oranını artırmak ve toksini amonyum asetat tuzundan arındırmak amacıyla uygulandı. Bu aşamada 2. mobil faz olarak %40 metanol kullanıldı. Diğer tüm parametreler yukarıdaki yöntemle aynı uygulandı. Bu sistemde de önce alfa amanitin standardı uygulandı, tutulma zamanı kaydedildi. Fraksiyonun sisteme verilmesinden sonra standart ile aynı zamanda gelen pik başlangıcından sonuna kadar fraksiyon toplayıcı ile alındı (Şekil 4). Elde edilen fraksiyonun hacmi ölçüldü. Bu fraksiyondaki saflık oranını ve toksin miktarını ölçmek için 20 µL analitik HPLC sistemine uygulandı.

Analitik HPLC sistemi: Yukarıdaki preparatif sisteme paralel olarak ayırıcı vana sonrasında analitik kolon kullanıldı. Bu amaçla 5 µm partiküllü, 4,6x250 mm C18 ODS kolon kullanıldı. Mobil faz olarak yukarıda tanımlanan 1. mobil faz kullanıldı. Mobil faz akış hızı izokratik olarak 1 mL/dak olarak ayarlandı.

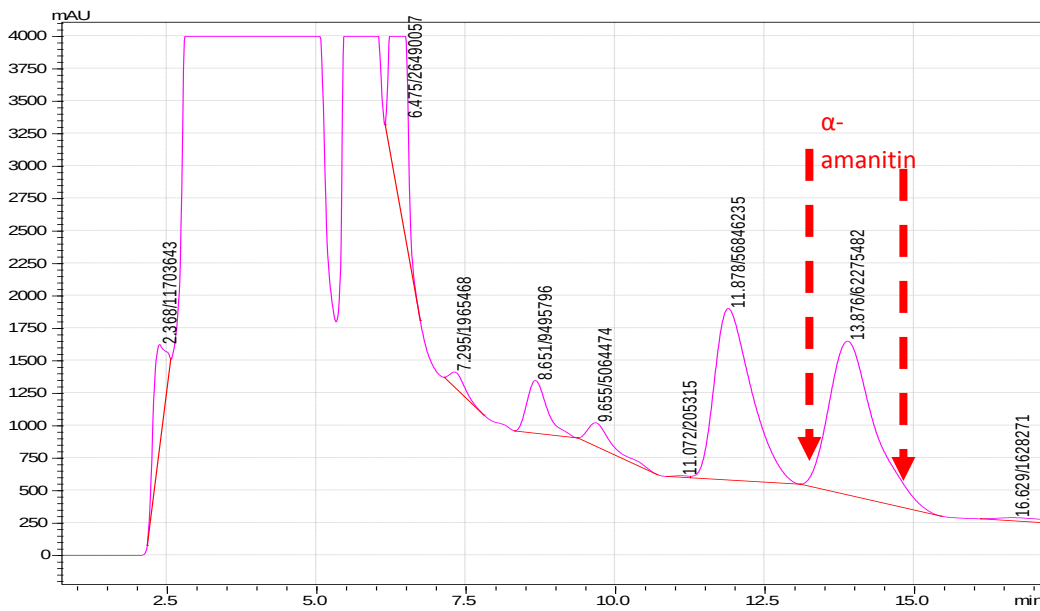
Saflık analizi: Analitik HPLC sisteminde elde edilen kromatogramdaki toksin pikinin tüm piklere oranı saflık oranı olarak kullanıldı. Ayrıca toksin pikinin kendi içindeki saflık oranı UV tarama ile yapıldı.

Miktar analizi: Analitik HPLC sisteminde alfa amanitin standardı için 6 noktalı (her biri 3 defa tekrarlı) kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisinin denklemine, analizlerde elde edilen pik alanları uygulanarak madde miktarı ölçümü yapıldı.

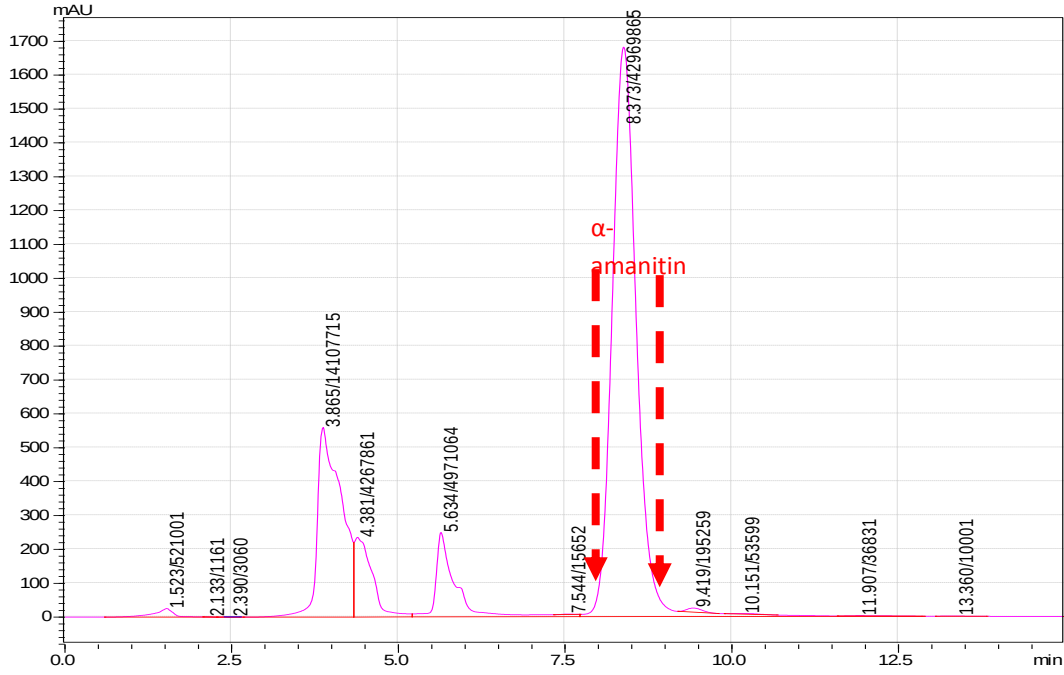
Toksinin doğrulanması: Elde edilen alfa amanitin toksininin doğrulanması için 2 yöntem kullanıldı. 1. olarak preparatif HPLC sisteminde tutulma zamanı, 2. olarak UV spektrumunda minimum ve maksimum absorbans değerleri ile genel spektrum yapısı karşılaştırıldı.

BULGULAR

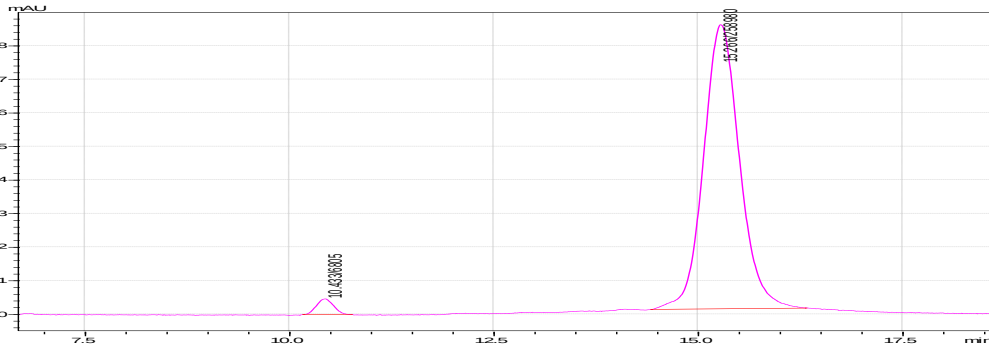
1. saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen alfa amanitin saflık oranı %93 ($\pm 1,24$) olarak bulundu. Bu işlemde alfa amanitin tutulma zamanı 8,37 dakikadır (Şekil 3). 2. saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen alfa amanitin saflık oranı %99,8 ($\pm 0,26$) olarak bulundu. Elde edilen alfa amanitin miktarı 384 ($\pm 5,49$) mg olarak ölçüldü. Analitik sistemde tutulma zamanı 15,27 dakika olarak görüldü (Şekil 5). Toksin pikinin kendi içindeki saflık indeksinin 0,99995 (± 0) olduğu görüldü (Şekil 6). Elde edilen toksin ile standardın UV spektrumlarında her ikisinde de 303 nm'de maksimum, 263 nm'de minimum absorbans olduğu ve spektrum yapısının aynı olduğu görüldü (Şekil 7).



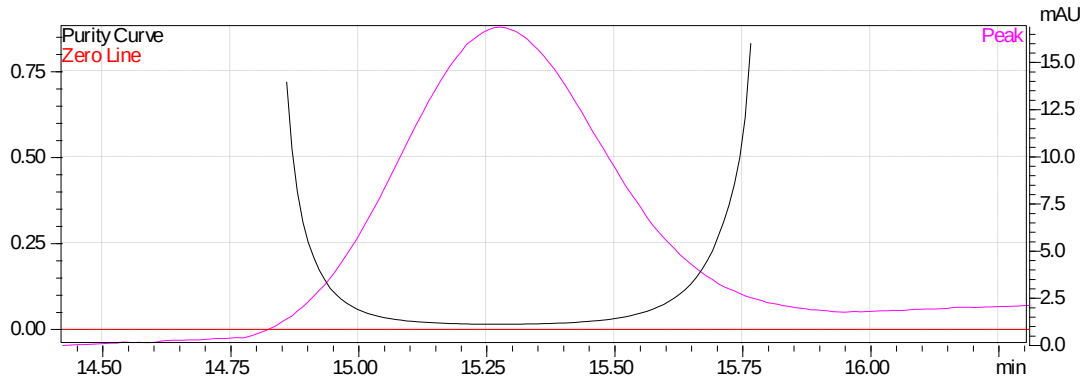
Şekil 3. Birinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitişi göstermektedir.



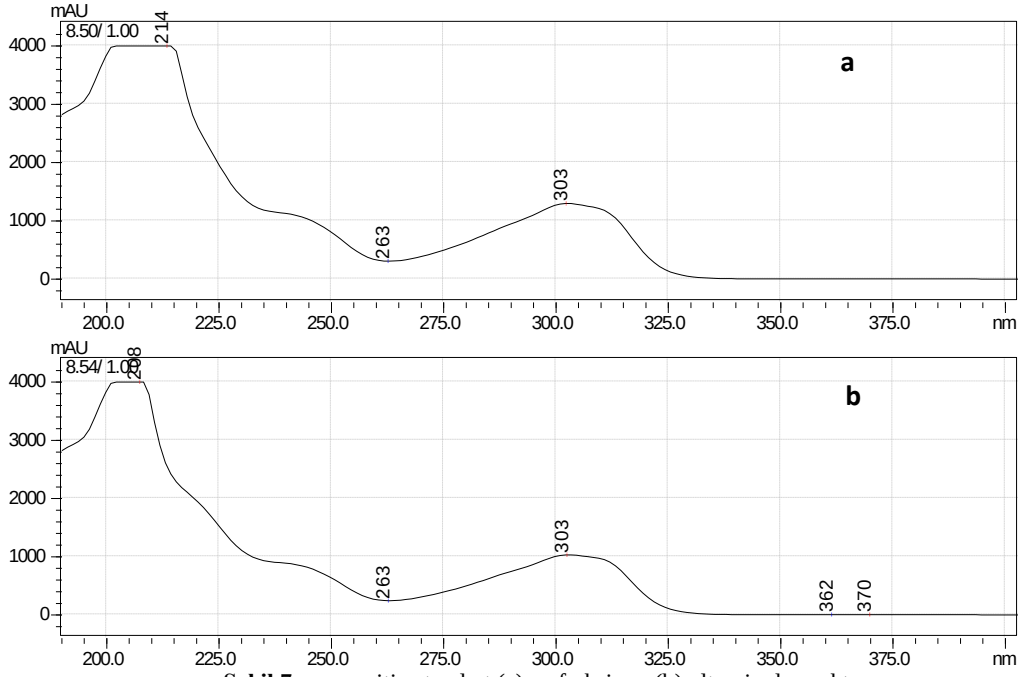
Şekil 4. İkinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitişini göstermektedir.



Şekil 5. Elde edilen alfa amanitinin analitik sistemdeki kromatogramı



Şekil 6. Alfa amanitin pikinin saflık analizi spektrumu



Şekil 7. α -amanitin standart (a) ve fraksiyon (b) ultraviyole spektrumu

TARTIŞMA

Alfa amanitinin UV spektrumunda 303 nm'de maksimum absorbansa sahip olduğu bilinmektedir (5). HPLC cihazlarında sıkça kullanılan UV dedektörler tek bir dalga boyunda tarama yaptığından, eğer birden fazla madde aynı anda dedektöre gelirse bunu anlamak mümkün olmamaktadır. Bu problemi aşmak için son yıllarda geliştirilen DAD dedektörler, tek dalga boyu yerine UV ve görünen alandaki tüm dalga boylarında tarama yapabilmektedir. Bu durumda 2 farklı madde aynı tutulma zamanında dedektöre gelse bile, ultraviyole absorbanlarındaki farklılık sayesinde DAD dedektörde bu safsızlık anlaşılabilir (13). Çalışmamızda elde ettiğimiz pik saflık indeksi değeri, elde ettiğimiz moleküllere başka bir maddenin karışmadığını ve sadece tek bir kimyasal madde elde ettiğimizi ispatlamaktadır. 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 alfa amanitin olduğu UV spektrumunun standardın spektrumuyla karşılaştırması sonucunda ispatlanmıştır. Ayrıca bu spektrum literatürde bildirilmiş olan alfa amanitin spektrumu ile aynıdır (5).

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 alfa amanitin miktarı ancak 3 seferde 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. Tanımladığımız bu yöntemle, yüksek saflıkta alfa amanitin uygun maliyetle elde edilmesi mümkündür.

KAYNAKLAR

1. Bresinsky A, Besl H. A Colour Atlas of Poisonous Fungi. London: Wolf Publishing, 1990; 24-9.
2. Mat A. Türkiye’de mantar zehirlenmeleri ve zehirli mantarlar. İstanbul: Nobel Yayınları, 2000; 15-63.
3. Işıloğlu M, Gücin F, Mat A. Kasım 1994’te İstanbul’da meydana gelen mantar zehirlenmeleri. Ekoloji-Çevre Dergisi 1995;14(4):22-8.
4. Vetter J. Toxins of Amanita Phalloides. Toxicon 1998;36(1):13-24.
5. Wieland T. [Structure and mode of action of the amatoxins]. [Article in German]. Naturwissenschaften. 1972;59(6):225-31.
6. Gong XQ, Nedialkov YA, Burton ZF. Alpha-amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II. J Biol Chem 2004;279(26):27422-7.
7. Faulstich H, Talas A, Wellhöner HH. Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. Arch Toxicol 1985;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;14(1):42-4.
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;27(12):3047-52.
10. Wieland T, Wieland O. Chemistry and toxicology of the toxins of Amanita phalloides: Pharmacol Rev 1959;11(1):87-107.
11. Mcknight TA, Mcknight KB, Skeels MC. Amatoxin and phallotoxin concentration in amanita bisporigera spores. Mycologia 2010;102(4):763-5.
12. Zhang P, Chen Z, Hu J, Wei B, Zhang Z, Hu W. Production and characterization of Amanitin toxins from a pure culture of Amanita exitialis. FEMS Microbiol Lett 2005;252(2):223-8. Epub 2005 Sep 15.
13. 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;744(1-2):167-76.