

GIDA VE YEMLERDEKİ MİKOTOKSİN VE BİTKİ TOKSİNLERİNİN TANIMLANMASINA İLİŞKİN KILAVUZ

GİRİŞ

Tanımlama, gıda ve yemdeki mikotoksinlerin ve bitki toksinlerinin doğrulayıcı analizinin ayrılmaz bir parçasıdır. Bu belge, diğer alanlardaki mevcut kriterler ve literatür verileri dikkate alınarak oluşturulmuş ve tartışılmıştır. Metodun geçerli kılınması ve numune analizi sırasında dikkate alınması gereken tanımlama için rehberlik kriterleri sağlar. Bu kılavuz, Numune Alma ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliğlerindeki “Doğrulama metotları için özel gereklilikler”i tamamlar.

TANIMLAMA GEREKSİNİMLERİ

Mikotoksinlerin ve bitki toksinlerinin tanımlanması için, kütle spektrometresi ile birleştirilmiş kromatografi tercih edilen metottur. Alternatif olarak floresan dedektörlü sıvı kromatografisi, yalnızca numune hazırlama sırasında hedeflenen toksin(ler) için seçici bir immünoafinite bazlı saflaştırma kullanıldığında uygulanabilir. UV veya FID tespitine dayalı metotların kullanılması tavsiye edilmez, ancak yeterli seçiciliğin gösterildiği halihazırda ortaya konmuş metotlar kullanılmaya devam edilebilir, bu tipik olarak patulin ve deoksinivalenol ve ayrıca GC-FID ile tespit edilen erusik asit için geçerlidir.

Aşağıda verilen kriterler, doğru tanımlamayı elde etmek için karşılanması gereken varsayılan kılavuz kriterlerdir. Metodun geçerli kılınması sırasında, standart eklenmiş numuneler veya sertifikalı referans malzemeler kullanılarak metodun konsantrasyon aralığı dahilinde kriterlerin karşılandığı doğrulanmalıdır. Bu, sonuçların raporlanacağı en düşük seviyeyi ve yasal maksimum seviyeleri içermelidir. Ayrıca, kör numuneler için yanlış pozitif tanımlamaların elde edilmediği doğrulanmalıdır.

KROMATOĞRAFI İÇİN GEREKLİLİKLER

İncelenen analit için kabul edilebilir minimum alıkonma süresi, kolonun ölü hacmine karşılık gelen alıkonma süresinin iki katı olmalıdır. Örnek ekstraktındaki analitin alıkonma süresi, hem gaz kromatografisinde hem de (ultra) yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ((U)HPLC) $\pm 0,1$ dakikalık bir toleransla aynı sırayla ölçülen kalibrasyon standartlarının ortalamasına karşılık gelmelidir. Klasik HPLC ve/veya izokratik akış için $\pm 0,1$ dakika kriterinin çok zorlayıcı olduğu durumlarda $\pm 0,2$ dakika veya yarı yükseklikteki pik genişliğinin $\pm 50\%$ 'si kabul edilebilir.

Bir analitin (internal standart) ^{13}C -izotop ile işaretlenmiş bir analogunun numuneye veya ekstrakta eklenmesi durumunda, analitin alıkonma süresi $\pm 0,05$ dakikalık bir toleransla işaretlenmiş internal standardıninkine karşılık gelmelidir.

FLORESAN TESPİT İÇİN GEREKLİLİKLER

Bu, doğal floresan sergileyen moleküller ve dönüşüm ya da türevlendirme sonrasında floresan sergileyen moleküller için geçerlidir. Kromatografik koşullarla birlikte ekzitasyon ve emisyon dalga boylarının seçimi, kör numune ekstraktlarında girişim yapan bileşenlerin oluşumunu en aza indirecek şekilde yapılmalıdır. Ekzitasyon ve emisyon dalga boyu arasında en az 50 nanometre olmalıdır. Kromatogramdaki maksimum en yakın pik, belirlenen analit pikinden analit pikinin maksimum yüksekliğinin 10% 'unda en az bir tam pik genişliği ile ayrılmalıdır.

KÜTLE SPEKTROMETRİK TESPİT İÇİN GEREKLİLİKLER

Tanımlama, uygun iyon seçimine dayanır. Analiz edilen matriksteki analit için ve ilgili konsantrasyon aralığında yeterince seçici olmalıdırlar. Moleküler iyonlar, (de)protonlanmış moleküller veya eklentiler oldukça karakteristiktir ve mümkün olduğunda ölçüm ve tanımlama prosedürüne dahil edilmelidir. Genel olarak ve özellikle tek aşamalı birim çözünürlüklü (single-stage unit resolution) MS'de, yüksek m/z iyonları düşük m/z iyonlarından daha seçicidir (örn. m/z <100). Bununla birlikte, su kaybı, ortak bileşenler veya eklenti kaybından kaynaklanan yüksek kütleli m/z parçalanma iyonları, genellikle daha az spesifik oldukları için çok az kullanılabilir ve bu nedenle tanımlama amaçları için daha az yararlı olabilirler. Tanımlama için iyon seçimi arka plan girişimlerine bağlı olarak değişebilir. Yüksek çözünürlüklü MS'de, analitin bir iyonunun seçiciliği, ekstrakte edilen iyon kromatogramını elde etmek için kullanılan kütle ekstraksiyon penceresinin (Mass extracton window - MEW) darlığı ile belirlenir. MEW ne kadar dar olursa seçicilik de o kadar yüksek olur.

Tanımlama, iki veya daha fazla (bkz. Tablo 1) seçici iyonun ekstrakte edilmiş iyon kromatogramlarında gözlemlenen kromatografik piklere dayanmalıdır. Pikler benzer bir pik şekline sahip olmalı, birbiriyle örtüşmeli ve iyon oranı (daha düşük alana sahip pikin yanıtının daha yüksek alana sahip pikin yanıtına bölünmesi olarak tanımlanır) aynı sekanstan kalibrasyon standartlarının ortalamasından elde edilene göre $\pm\%30$ (bağıl) içinde olmalıdır. Piklerin dedektörün doğrusal aralığı içinde olması ve en az 3 sinyal-gürültü (S/N) oranına sahip olması gerekir. Ekstrakte edilmiş bir iyon kromatogramının önemli bir girişim kanıtı göstermesi durumunda, tanımlama için buna güvenilmemelidir.

Ölçülen iyonların seçicilik derecesine ek olarak, kütle spektrometrik tespitin farklı türleri ve modları, tanımlamadaki güvenle ilgili olan farklı seçicilik dereceleri sağlar. Tanımlama için gereklilikler Tablo 1'de verilmiştir. Bunlar, bir analitin varlığını veya yokluğunu kanıtlamak için mutlak kriterler olarak değil, rehberlik kriterleri olarak kabul edilmelidir.

Tablo 1. Farklı MS teknikleri için tanımlama gereksinimleri¹

MS dedektörü/Özellikler		Veri toplama (Acquisition)	Tanımlama için gerekenler	
Çözünürlük	Tipik sistemler (örnekler)		Minimum iyon sayısı	Ek olarak
Birim kütle çözünürlüğü (Unit mass resolution)	Tek MS	tam tarama (SCAN), sınırlı m/z aralığı, SIM	3 iyon	S/N $\geq 3^{(d)}$ Ekstrakte edilen iyon kromatogramlarındaki iyonlardan elde edilen analit pikleri tamamen örtüşmelidir. Örnek ekstraktlarından elde edilen iyon oranı, aynı sekanstan elde edilen kalibrasyon standartlarının ortalamasının $\pm\%30$ 'u (bağıl) içinde olmalıdır
	MS/MS üçlü kuadrupol, iyon-trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	Seçilmiş veya çoklu reaksiyon izleme (SRM, MRM), ana-iyon izolasyonu için birim kütle çözünürlüğüne eşit veya daha iyi kütle çözünürlüğü	2 parçalanma iyonu	
Doğru kütle ölçümü	Yüksek çözünürlüklü	Tam tarama, sınırlı m/z aralığı,	kütle doğruluğu ≤ 5	S/N $\geq 3^{(d)}$ Çıkarılan iyon

¹ Kütle spektrometrisi ile ilgili terimlerin tanımı için bakınız Murray et al. (2013) Pure Appl. Chem., 85:1515-1609

(Accurate mass measurement)	MS: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap	SIM, ana-iyon seçimi olan veya olmayan parçalanma veya bunların kombinasyonları	ppm ^(a, b, c) olan 2 iyon	kromatogramlarında ana ve/veya parçalanma iyon(lar)ından gelen analit pikleri tamamen örtüşmelidir. İyon oranı: ^(e)
a) tercihen moleküler iyon, (de)protonlanmış molekül veya eklenti iyonu dahil b) en az bir fragman iyonu içeren c) m/z <200 için <1 mDa d) Görsel değerlendirmeye dayalı olarak; gürültü olmaması durumunda, takip eden en az 5 taramada bir sinyal bulunmalıdır e) Veri toplama koşullarına bağlı olarak, özellikle geniş ana-iyon seçim pencereleri durumunda daha yüksek değişkenlik gözlemlenebilir. Bu nedenle, %30'u aşan sapmalar kabul edilebilir.				

BELİRLİ TOKSİNLER İÇİN HÜKÜMLER

Bazı toksinler için çoklu izomerler mevcuttur. Bunlar aynı MS/MS geçişlerini verebilir, ancak her zaman aynı iyon oranlarında olmayabilir. Uygun alternatif geçişler mevcut olmadığında ve izomerler kromatografik olarak ayıramadığında, tanımlama için iyon oranı kriterlerini karşılama konusunda sorunlar ortaya çıkabilir. Bu gibi durumlarda, $\pm\%30$ bağıl iyon oranı kriterinden sapmalar kabul edilebilir.

Bu durumun bilinen bir örneği pirolizidin alkaloidlerinin belirli izomerleridir.