



**BIOR**

PĀRTIKAS DROŠĪBAS, DZĪVNIĒKU VESELĪBAS  
UN VIDES ZINĀTNISKAIS INSTITŪTS

**INSTITŪTA “BIOR”**

**ATSKAITE**

**PIROLIZIDĪNA ALKALOĪDU  
IZPLATĪBAS IZPĒTE LATVIJAS  
IZCELSMES PĀRTIKAS PRODUKTOS**

Izpildītājs:

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības  
un vides zinātniskais institūts “BIOR”

**RĪGA 2020**

APSTIPRINU  
Zemkopības ministrijas  
Veterinārā un pārtikas departamenta direktore  
Zanda Matuzale

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"

Zemkopības ministrijas pasūtītais zinātniskais pētījums

Līgums Nr.20-00-SOINV05-000027

**PIROLIZIDĪNA ALKALOĪDU IZPLATĪBAS IZPĒTE LATVIJAS IZCELSMES PĀRTIKAS  
PRODUKTOS**

**GALA ATSKAITE**

Rīga

2020

## SATURA RADĪTĀJS

Ievads.....	4
Analīzes metodes.....	5
Noteikšanas metode.....	8
Materiāli un izejvielas .....	8
Paraugu sagatavošana.....	9
Analīzes veikšana .....	9
Rezultātu izvērtēšana .....	10
Rezultāti un to izvērtējums.....	14
Medus paraugi .....	14
Zāļu tējas paraugi .....	19
Piena un tinktūras paraugi .....	22
Kvantificēšanas robežas .....	23
Metodes nenoteiktība.....	24
Secinājumi .....	26
Izmantotā literatūra .....	27

## IEVADS

Pirolizidīna alkaloidi (PA) ir viena no augu sintezēto alkaloidu grupām, ko augs uzkrāj savā organismā, lai novērstu kukaiņu, kaitēkļu un dzīvnieku iedarbību. Šobrīd ir zināmi vismaz 600 PA, kas augos galvenokārt ir sastopami necīna (aminospirta) esteru (mono-, di- un makrocikliskie diesteri), 1,2-piesātināto un/vai 1,2-nepiesātināto neicīnskābes esteru un N-oksīdu veidā. Ir zināmi vairāk kā 6000 PA saturoši augi, no kuriem vairāki (heliotropi, krustaines, un tauksaknes) ir iekļauti lietošanai pārtikā aizliedzamo augu sarakstā saskaņā ar Zemkopības ministrijas normatīvo aktu "Noteikumi par izmantošanai pārtikā aizliegtajiem augiem un augu daļām".

PA toksiskās īpašības var būtiski atšķirties, tomēr pēdējo gadu pētījumos konstatēts, ka aptuveni puse no visiem PA ir citotoksiski, hepatotoksiski, genotoksiski un kancerogēni.

Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestādes (EFSA) 2017. gada atzinumi par PA izplatību un toksisko ietekmi satur norādes, ka šie alkaloidi ziedputekšņu pārneses, kā arī PA saturošu nezāļu ietekmē var piesārņot PA-nesintezējošus medicīniskos augus, tai skaitā tradicionālās *Camellia sinensis* tējas, to uzlējumus, kā arī var uzkrāties medū, kā arī dažādu augu izcelsmes uztura bagātinātāju sastāvā. Tādējādi, PA piesārņojums var potenciāli radīt gan akūtas, gan hroniskas iedarbības riskus patērētājam.

EFSA 2016. gada monitoringa dati par PA izplatību tējās un medū iekļāva 17 biežāk sastopamos PA, kurus Eiropas Komisija (EK) 2018. g. ziņojumā papildināja vēl ar četriem PA, kuru monitorēšanu ieteicams veikt Eiropas dalībvalstīs: intermedīns, likopsamīns, seneksionīns, seneksivernīns, seneksi(o)filīns, retrorsīns, ehimidīns, lasiokarpīns, senkirkīns, europīns, heliotrīns un to N-oksīdi.

Šobrīd Pārtikas aprites piesārņotāju grupa (CONTAM Panel) noteikusi PA patēriņa references normu 237 µg/kg/dienā, kas rada potenciālu kancerogēnu risku.

Šajā pētījumā tika izstrādāta augstas izšķirtspējas masspektrometrijas metode PA kvantitatīvā satura noteikšanai un citu PA struktūranalogu nemērķētam skrīningam Latvijā pieejamās pārtikas produktu riska grupās, kas var potenciāli saturēt šo alkaloidu piesārņojumu. Izstrādātā metode tika pielietota PA satura noteikšanai 80 pārtikas produktu paraugos.

## ANALĪZES METODES

Pirrolizidīna alkaloidu noteikšanai tiek izmantotas un aprakstītas dažādas metodes, kuras balstās uz šķīdumu hromatogrāfiju un augstas izšķirtspējas masspektrometriju (1. pielikums).

Pārsvārā PA detektēšanai un kvantificēšanai izmanto šķīduma hromatogrāfu, kurš ir savienots ar masspektrometrisko detektoru. Lielākajā daļā aprakstītajās metodēs, paraugus attīra ar SPE kolonnām, lai uzlabotu metodes jutību, reproducējamību un atgūstamību. Gandrīz visās aprakstītajās metodēs izmanto C18 kolonnas un tikai vienā metodē tiek izmantota C8 kolonna. Viszemākā reproducējamība ir metodei, kurā izmanto Luna Omega Polar C18 kolonnu [1], bet vislielākā reproducējamība ir metodei ar Nucleoshell C18 reversed phase kolonnu un ekstrakciju ar atšķaidītu sērskābes šķīdumu [2]. Viszemākā atkārtojamība ir C8 kolonnai [3], bet vislielākā ir Hypersil Gold C18 kolonnai kombinācijā ar detektoru TSQ Vantage [4]. Vislabākā atgūstamība ir 7. aprakstītai metodei, kurā izmanto ZORBAX C18 kolonnu un netiek veikta SPE attīrīšanas procedūra, ekstrakcijai izmanto dejonizētu ūdeni [5].

Ekstrakcijai bieži izmanto atšķaidītu sērskābes šķīdumu, kā arī paskābināto dejonizētu ūdeni ar skudrskābi. Pārsvārā SPE kolonnas aktivizē ar metanolu, sērskābes šķīdumu un pēc ekstrakta filtrēšana, kolonnas eluē ar 2,5% amonjaka šķīdumu metanolā. Dažādās metodēs tika aprakstīts, ka iegūto attīrīto ekstraktu ietvaicē slāpekļa plūsmā. Pēc ietvaicēšanas tika iegūts sauss ekstrakts, kuru rekonstruē vai ar acetonitrils:ūdens (5:95) šķīdumu, vai ar metanols:ūdens (5:95) šķīdumu, vai ar tīro metanolu [6], [7], [8].

Tika aprakstītas dažādas LOQ (kvantitatīvās noteikšanas robeža) vērtības, pārsvārā tās ir lielākas par 0,03 µg/kg, bet ne zemākas par 2 µg/kg.

Salīdzinot attīrīšanas metodes, var secināt, ka SPE attīrīšanas procedūru var neizmantot, jo medus matrica nav tik sarežģīta, pietiekami izmantot filtrēšanu un attīrīšanu ar sāļiem. Pēc parametriem ir redzams, ka procedūrā, neizmantojot SPE attīrīšanas pieeju, atgūstamība dažos gadījumos ir pat labāka nekā ar SPE procedūru. Dažās metodēs izmanto cinka pulveri, lai reducētu *N*-oksīdus, bet tas neļauj precīzi noteikt oksīdu koncentrāciju paraugos. 6. aprakstītajā metodē izmanto modificētu QuEChERS metodi, lai attīrītu paraugus, kā arī ekstrakciju ar acetonitrilu un ūdeni, metode paredzēta PA noteikšanai barībā. Dzīvnieku barība satur vairākas traucējošas vielas, tāpēc šo paraugu attīrīšanai ir nepieciešams izmantot QuEChERS sāļu maisījumu [9].

Literatūrā aprakstītās metodes ir izstrādātas, lai noteiktu pirolizidīna alkaloidus medū, tējā, bišu ziedputekšņos un barībā, savukārt PA noteikšana citās matricās, piemēram, uzlējumos vai pienā, nav piedāvāta.

Šajā pētījumā izstrādātājā metodē izmanto acetonitrilu un ūdeni kā ekstrakcijas šķīdumu, QuEChERS sāļu maisījumu, lai attīrītu parauga matricu, izsaldēšanu un ekstraktu atšķaidīšanu. LOQ vērtības ir diapazonā

0,027 – 20 µg/kg atkarībā no matricas, kā arī korelācijas koeficients ir lielāks par 0,95. Metode ietver pirrolizidīna alkaloidu un to *N*-oksīdu noteikšana (1. tabula).

1. tabula

**Pirrolizidīna alkaloidu un to *N*-oksīdu saraksts**

PA un to <i>N</i> -oksīdu nosaukums	Struktūrformula	PA un to <i>N</i> -oksīdu nosaukums	Struktūrformula	PA un to <i>N</i> -oksīdu nosaukums	Struktūrformula
Ehimidīns		Eiropīna <i>N</i> -oksīds		Indicīns	
Ehimidīna <i>N</i> -oksīds		Heliosupīns		Indicīna <i>N</i> -oksīds	
Ehinatīns		Heliosupīna <i>N</i> -oksīds		Integerimīns	
Ehinatīna <i>N</i> -oksīds		Heliotrīns		Integerimīna <i>N</i> -oksīds	
Eiropīns		Heliotrīna <i>N</i> -oksīds		Intermedīns	

1. tabulas turpinājums

PA un to <i>N</i> - oksīdu nosaukums	Struktūrformula	PA un to <i>N</i> - oksīdu nosaukums	Struktūrformula	PA un to <i>N</i> -oksīdu nosaukums	Struktūrformula
Intermedīna <i>N</i> - oksīds		Retrosīns		Senecifilīna <i>N</i> - oksīds	
Lasiokarpīns		Retrosīna <i>N</i> - oksīds		Senecivernīns	
Lasiokarpīna <i>N</i> - oksīds		Senecionīns		Senecivernīna <i>N</i> - oksīds	
Likopsamīns		Senecionīna <i>N</i> - oksīds		Senkirkīns	
Likopsamīna <i>N</i> - oksīds		Senecifilīns		Usaramīns	

## NOTEIKŠANAS METODE

### Institūtā "BIOR" pielietotā metode pirolizidīna alkaloīdu noteikšanai ar nanoplūsmas šķidruma hromatogrāfiju un masspektrometriju

Metode ietver parauga (medus, tējas vai piena) ekstrakciju ar acetonitrilu, paraugu attīrīšanu ar QuEChERS sāļu maisījumu, izsaldēšanu, ekstraktu atšķaidīšanu (tinktūru gadījumā paraugu sagatavošana sāka ar sausā atlikuma atšķaidīšanu pēc iztvaicēšanas), filtrēšanu un pirolizidīna alkaloīdu noteikšanu ar nanoplūsmas šķidruma hromatogrāfiju un elektroizsmidzināšanas jonizācijas augstas izšķirtspējas masspektrometriju, izmantojot standartpiedevu metodi kalibrēšanai.

#### Materiāli un izejvielas

Ekstrakcijai izmantots acetonitrils (šķidruma hromatogrāfijai piemērotas tīrības), dejonizēts ūdens (no *Milli-Q* attīrīšanas iekārtas), skudrskābe (reāģenta tīrības, atbilstoši ACS kritērijiem), QuEChERS EN 15562 sāļu maisījums (4,0 g bezūdens magnija sulfāta, 1,0 g nātrija hlorīda, 1,0 g trinātrija citrāta dihidrāta, 0,5 g dinātrija citrāta seskvihidrāta).

Ekstraktu filtrēšanai izmantoti PVDF centrifūgas membrānas filtri ar 0,45 μm poru izmēru. Ekstraktu atšķaidīšanai izmantots acetonitrils un dejonizēts ūdens (šķidruma hromatogrāfijai un masspektrometrijai piemērotas tīrības).

Kalibrēšanai ar standartpiedevu metodi izmantoti pirolizidīna alkaloīdu standartšķīdumi, kas pagatavoti no tīrām vielām (ar vismaz 95% tīrību): ehimidīna, ehimidīna-*N*-oksīda, ehinatīna, ehinatīna-*N*-oksīda, eiropīna hidrohlorīda, eiropīna-*N*-oksīda, heliosupīna, heliosupīna-*N*-oksīda, heliotrīna, heliotrīna-*N*-oksīda, indicīna hidrohlorīda, indicīna-*N*-oksīda, integerimīna, integerimīna-*N*-oksīda, intermedīna, intermedīna-*N*-oksīda, lasiokarpīna, lasiokarpīna-*N*-oksīda, likopsamīna, likopsamīna-*N*-oksīda, retrorsīna, retrorsīna-*N*-oksīda, senecionīna, senecionīna-*N*-oksīda, senecifilīna, senecifilīna-*N*-oksīda, senecivernīna, senecivernīna-*N*-oksīda, senkirkīna, usaramīna.



## Paraugu sagatavošana

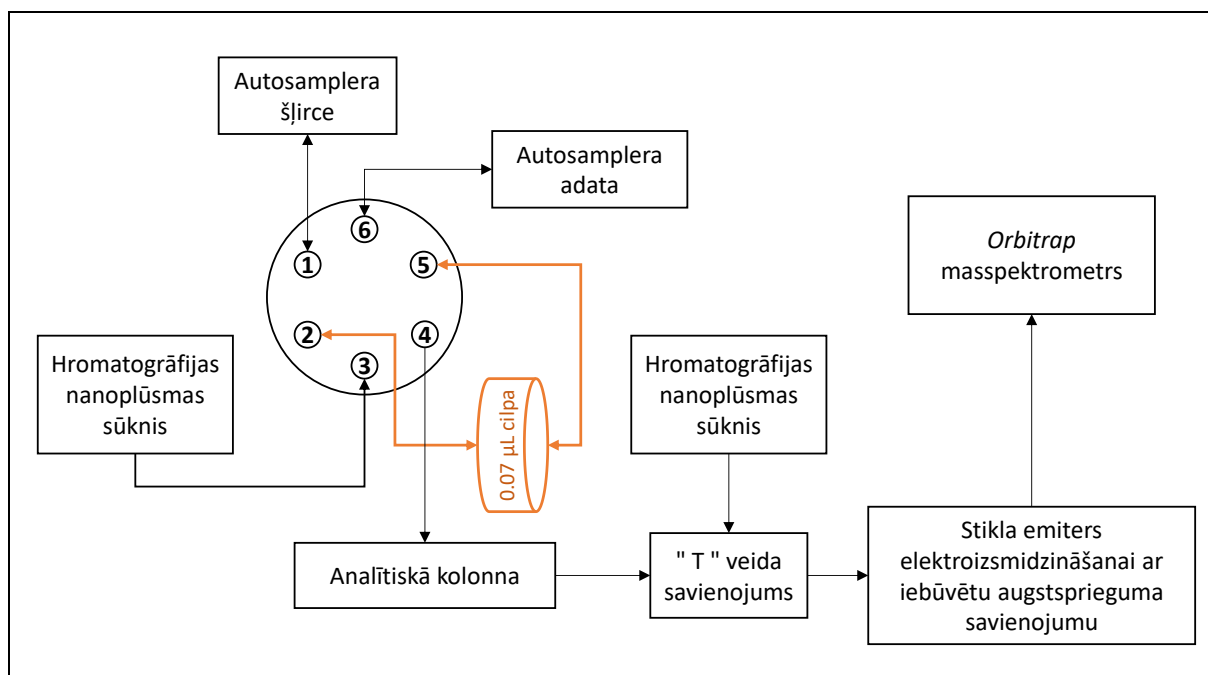
Katrs pārtikas (medus, tējas, piena) paraugs homogenizēts un iesvērti katram paraugam vismaz divi  $2,00 \pm 0,05$  g iesvari (medum un tējai) un  $10,00 \pm 0,05$  g iesvari (pienam), no kuriem atkārtotajiem iesvariem pievienotas pirolizidīna alkaloīdu standartpievevas kalibrēšanai (piemēram, 4, 8, 20, 40 un/vai 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , atkarībā no gaidāmās koncentrācijas paraugā un kalibrēšanas punktu skaita). Visiem iesvariem (izņemot piena paraugiem) pievienoti 10 mL dejonizēta ūdens. Visiem iesvariem pievienoti 10 mL acetonitrila un 200  $\mu\text{L}$  skudrskābes. Paraugi ievietoti ultraskaņas vannā uz 10 min, pēc tam visiem ekstraktiem pievienots QuEChERS EN 15562 sāļu maisījums un ekstrakti kratīti 10 min rotējošajā kratītājā. Pēc tam ekstrakti centrifugēti pie 4500 apgr./min. 5 mL ekstraktu augšējo šķidro slāņu pārnesti tīros stobriņos un ievietoti saldētavā ( $-80$  °C) uz 30 min. Saldētie ekstrakti ievietoti centrifūgā, kuras temperatūra ir 15 °C, un centrifugēti 18 min pie 4000 apgr./min un 15 °C. 200  $\mu\text{L}$  augšējo šķidro slāņu pārnesti stobriņos un iztvaicēti zem slāpekļa plūsmas pie 60 °C līdz sausam atlikumam.

Katram tinktūras paraugam iesvērti vismaz divi  $200 \pm 5$  mg iesvari, no kuriem atkārtotajiem iesvariem pievienotas pirolizidīna alkaloīdu standartpievevas kalibrēšanai (piemēram, 4, 8, 20, 40 un/vai 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , atkarībā no gaidāmās koncentrācijas paraugā un kalibrēšanas punktu skaita). Tinktūru paraugi iztvaicēti zem slāpekļa plūsmas pie 60 °C līdz sausam atlikumam.

Iztvaicētie sausie atlikumi izšķīdināti 1% skudrskābes un 1% acetonitrila ūdens šķīdumā – 300  $\mu\text{L}$  (medus, piena un tinktūru gadījumā) vai 1500  $\mu\text{L}$  (tējas gadījumā). Iegūtie ekstrakti filtrēti caur centrifūgas filtriem, un filtrāti iepildīti stikla pudelītēs hromatogrāfijai.

## Analīzes veikšana

Pirolizidīna alkaloīdu noteikšana veikta, injicējot filtrētos ekstraktus nanoplūsmas šķidrums hromatogrāfā (1. att.), kas aprīkots ar oktadecilsilāna reversās fāzes kapilāro kolonnu un papildus sūkni šķīdinātāja pievienošanai pēc kolonnas, kā arī ir pievienots augstas izšķirtspējas *Orbitrap* masspektrometram, izmantojot stikla emiteri elektroizsmidzināšanai. Injicēšana veikta atbilstoši pilnas cilpas injekcijas metodei.



1. att. Analīzei izmantojamā nanoplūsmas šķidruma hromatogrāfa principiālā shēma

Optimālai savienojumu atdalīšanai uz kolonnu padotas kustīgās fāzes (dejonizēts ūdens un acetonitrils, kuri satur 1% skudrskābes) pēc gradienta programmas, kuras ilgums ir 45 min, savukārt caur "T" veida savienojumu plūsmai pēc kolonnas ar hromatogrāfijas nanoplūsmas sūkni pievienots 80% acetonitrila ūdens šķīdums (šķidruma hromatogrāfijai un masspektrometrijai piemērotas tīrības) ar plūsmu attiecību 1:1, lai stabilizētu nanoplūsmas elektroizsmidzināšanas procesu gradienta eluēšanas laikā. Visiem plūsmas ceļiem jābūt savienotiem ar augsta spiediena savienojumiem (piemēram, *Thermo Scientific nanoViper™* vai *IDEX Health & Science MicroTight™*).

Masspektrometra jonizācijas avots konfigurēts nanoplūsmas elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā. Masspektrometrs veic prekursora jonu izolēšanu, fragmentāciju un fragmentu vienlaicīgu detektēšanu pie maksimālās izšķirtspējas 70 000 vienību.

## Rezultātu izvērtēšana

Detektētajām smailēm veikta fragmentācijas spektra izvērtēšana, salīdzinot fragmentācijas spektrus ar spektriem, kas iegūti tīru standartvielu analīzē. Metodes linearitāte ( $R^2 > 0,95$ ) tika pārbaudīta, konstruējot kalibrēšanas taisnes no paraugiem, kas sagatavoti atbilstoši standartpiedevu kalibrēšanas metodei, bet pirolizidīna alkaloīdu koncentrācija paraugos noteikta ar viena punkta kalibrēšanu katram paraugam pēc standartpiedevu metodes (2. att.).

Izolēto prekursora jonu un galveno detektēto fragmenta jonu  $m/z$ 

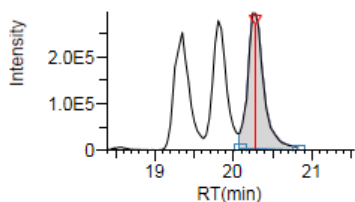
Nosaukums	Prekursora jona $m/z$	Fragmenta jona $m/z$	Kolizijas enerģija
Ehimidīna- <i>N</i> -oksīds	414,2122 [M+H]	254,1382	30
		396,2014	30
Ehimidīns	398,2173 [M+H]	120,0808	30
		83,0497	30
Ehinatīna- <i>N</i> -oksīds	316,1755 [M+H]	172,0966	30
		111,0682	30
Ehinatīns	300,1805 [M+H]	96,0812	30
		138,0911	30
Eiropīna- <i>N</i> -oksīds	346,1860 [M+H]	172,0966	30
		328,1749	30
Eiropīns	330,1911 [M+H]	138,0911	30
		156,1018	30
Heliosupīna- <i>N</i> -oksīds	414,2122 [M+H]	120,0808	30
		138,0912	30
Heliosupīns	398,2173 [M+H]	120,0808	30
		220,1329	30
Heliotrīna- <i>N</i> -oksīds	330,1911 [M+ H]	172,0966	30
		111,0682	30
Heliotrīns	314,1962 [M+H]	138,0911	30
		156,1018	30
Indicīna- <i>N</i> -oksīds	316,1755 [M+H]	172,0966	30
		94,0656	30
Indicīns	300,1805 [M+H]	94,0656	30
		156,1018	30
Integerimīna- <i>N</i> -oksīds	352,1755 [M+H]	94,0656	<b>50</b>
		118,0653	<b>50</b>
Integerimīns	336,1805 [M+H]	120,0808	<b>35</b>
		138,0911	<b>35</b>
Intermedīna- <i>N</i> -oksīds	316,1755 [M+H]	172,0966	30
		138,0911	30
Intermedīns	300,1805 [M+H]	94,0656	30
		156,1018	30
Lasiokarpīna- <i>N</i> -oksīds	428,2279 [M+H]	254,1382	30
		120,0810	30
Lasiokarpīns	412,2330 [M+H]	120,0810	30
		336,1799	30
Likopsamīna- <i>N</i> -oksīds	316,1755 [M+H]	172,0966	30

Nosaukums	Prekursora jona <i>m/z</i>	Fragmenta jona <i>m/z</i>	Kolīzijas enerģija
		138,0911	30
Likopsamīns	300,1805 [M+H]	94,0656	30
		156,1018	30

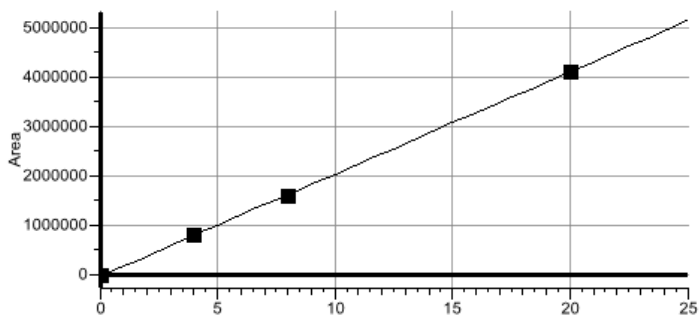
*2. tabulas turpinājums*

Nosaukums	Prekursora jona <i>m/z</i>	Fragmenta jona <i>m/z</i>	Kolīzijas enerģija
Retrorsīna- <i>N</i> -oksīds	368,1704 [M+H]	138,0911	<b>50</b>
		120,0808	<b>50</b>
Retrorsīns	352,1755 [M+H]	120,0808	30
		138,0911	30
Senecifilīna- <i>N</i> -oksīds	350,1598 [M+H]	94,0656	30
		120,0808	30
Senecifilīns	334,1649 [M+H]	120,0808	30
		306,1696	30
Senecionīna- <i>N</i> -oksīds	352,1755 [M+H]	94,0656	<b>50</b>
		120,0808	<b>50</b>
Senecionīns	336,1805 [M+H]	94,0656	<b>35</b>
		120,0808	<b>35</b>
Senecivernīna- <i>N</i> -oksīds	352,1755 [M+H]	94,0656	30
		120,0808	30
Senecivernīns	336,1805 [M+H]	120,0808	<b>35</b>
		308,1851	<b>35</b>
Senkirkīns	366,1911 [M+H]	168,1016	30
		122,0601	30
Usaramīns	352,1755 [M+H]	120,0810	30
		138,0911	30

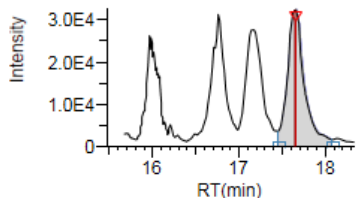
0029---80M+20 Senecionine



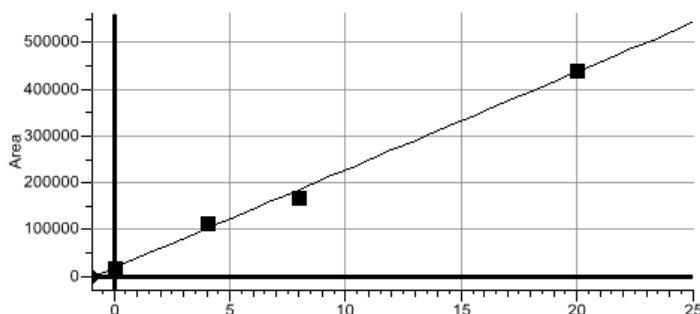
Senecionine  
 $Y = 2.072e5X - 3.604e4$ ;  $R^2: 0.9998$ ; Origin: Ignore; W: Equal; Area Standard Addition



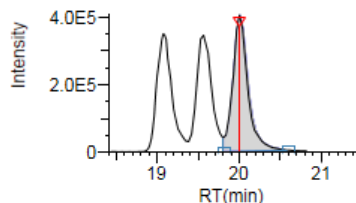
0027---29T+20 Senecionine



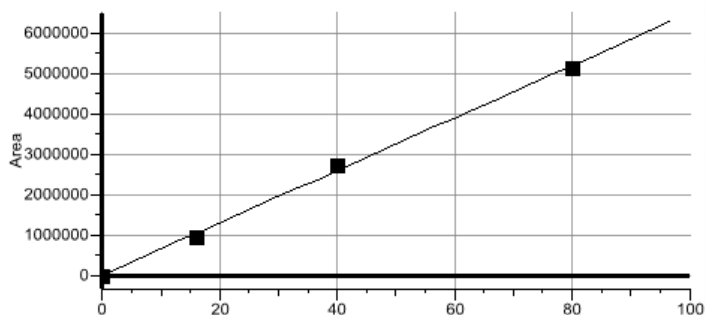
Senecionine  
 $Y = 2.094e4X + 1.873e4$ ;  $R^2: 0.9955$ ; Origin: Ignore; W: Equal; Area Standard Addition



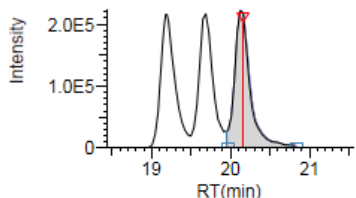
0000---31U+80 Senecionine



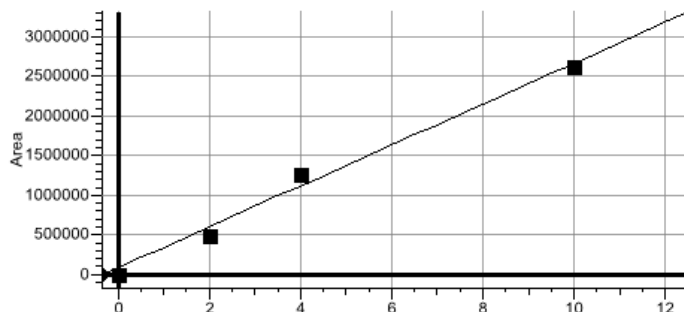
Senecionine  
 $Y = 6.482e4X + 1.277e4$ ;  $R^2: 0.9964$ ; Origin: Ignore; W: Equal; Area Standard Addition



0004---51P+10 Senecionine



Senecionine  
 $Y = 2.581e5X + 8.573e4$ ;  $R^2: 0.9858$ ; Origin: Ignore; W: Equal; Area Standard Addition

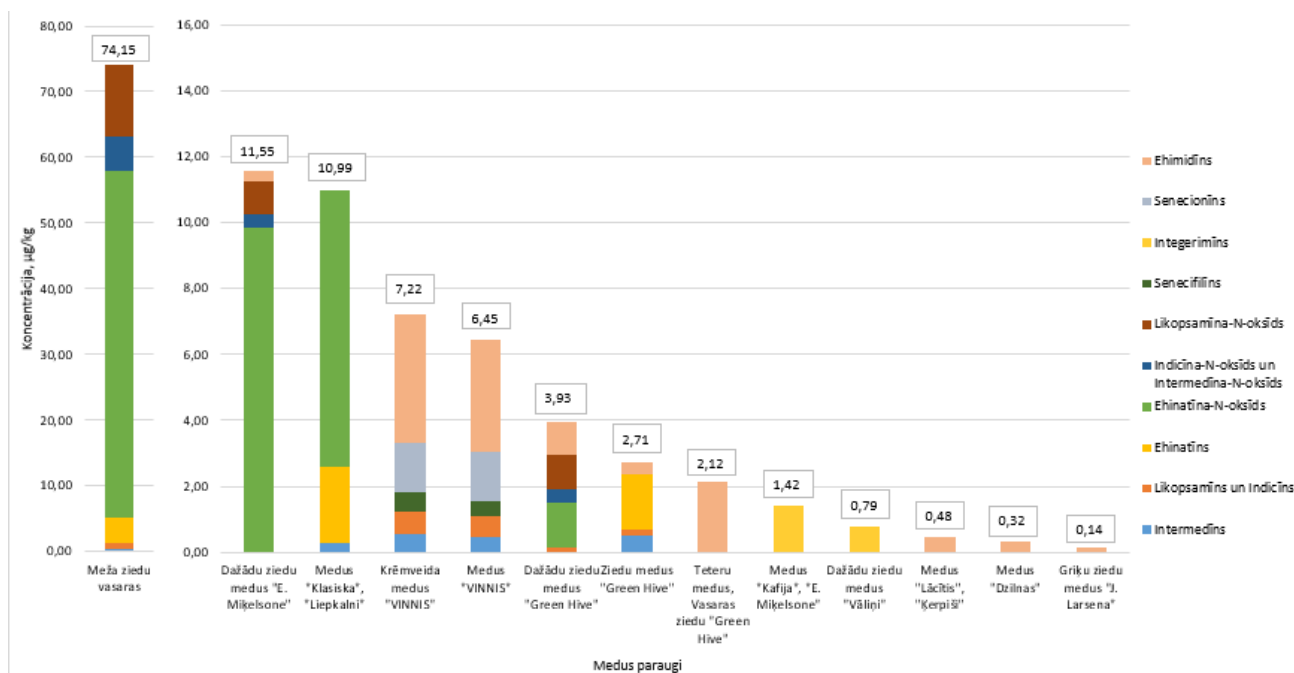


2. att. Senecionīna hromatogrammas un kalibrēšanas taisnes dažādos diapazonos, dažādos paraugos (attiecīgi – medus, tēja, tinktūra, piens), kuros senecionīns netika konstatēts

## REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Šajā pētījumā tika analizēti 80 Latvijas izcelsmes produkti: zāļu tējas, augu uzlējumi, medus un piens.

### Medus paraugi



### 3. att. PA iegūtie rezultāti Latvijas izcelsmes medū

Tika analizēti 40 medus paraugi, kuri savākti un ražoti Latvijā (3. att.). Saskaņā ar iegūtiem datiem, 32,5% no visiem medus paraugiem bija kvantificēta pirolizidīna alkaloīdu koncentrācija, kas ir lielāka par kvantificēšanas robežas (LOQ). Rezultātos tiek aprakstīti tikai tie paraugi, kuriem bija detektēts PA koncentrācijas, kuras ir lielākas par LOQ vērtību.

Medus paraugos tika konstatēti sekojoši pirolizidīna alkaloīdi: intermedīns, likopsamīns un indicīns, ehinatīns, ehinatīna-*N*-oksīds, indicīna-*N*-oksīds un intermedīna-*N*-oksīds, likopsamīna-*N*-oksīds, senecifilīns, integerimīns, senecionīns, ehimidīns. Visbiežāk medus paraugos ir sastopami ehimidīns, intermedīns, likopsamīns un indicīns, kas sakrīt ar citām publikācijām [3], savukārt vislielākā PA summa tika novērota meža ziedu vasaras medum, kas ir 74,15 µg/kg, bet vismazākā summa tiek kvantificēta griķu ziedu medum no J. Larsenas, kas ir tikai 0,14 µg/kg. Ehinatīna-*N*-oksīda koncentrācija meža ziedu vasaras medū procentuāli ir 71,1% no kopējās PA summas paraugā, kas ir 52,75 µg/kg.

Iegūtie rezultāti demonstrē sakarību, saskaņā ar kuru medus paraugiem ar vienu komponentu (griķu ziedu medus un liepziedu medus), tika detektētas ļoti nelielas PA koncentrācijas. Pārējie paraugi iekļauj dažādu ziedu maisījumu. Var secināt, ka jo vairāk ziedu sugas ir sastāvā, jo lielāka ir PA koncentrācija. Bez tam ir redzama sakarība starp medus krāsu un alkaloīdu saturu, jo tumšajam medum ir detektētas ļoti zemas

koncentrācijas vai vispār nekas nav detektēts. Iespējams, ka tas ir saistīts ar medus sastāvu, jo tumšā medus sastāvā visticamāk ir griķu ziedi, kurā lielākajā daļā gadījumu PA netika detektēti. Šī parādība sakrīt ar literatūras datiem, ka bieži griķu ziedu medu izmanto kā tīro matricu [6]. Rezultāti parāda, ka *N*-oksīdu koncentrācija ir zemāka salīdzinājumā ar pašu alkaloīdu saturu.

3. tabula

#### Kopsavilkums par PA saturu medū

PA	Paraugu skaits	Vidējā koncentrācija, µg/kg	Mediāna, µg/kg	Min. – Max. saturs, µg/kg
Intermedīns	5	0,44	0,46	< LOQ – 0,53
Likopsamīns un indicīns	5	0,50	0,66	< LOQ – 0,76
Ehinatīns	3	2,65	2,32	< LOQ – 3,95
Ehinatīna- <i>N</i> -oksīds	4	18,09	9,12	< LOQ – 52,75
Indicīna- <i>N</i> -oksīds un Intermedīna- <i>N</i> -oksīds	3	2,06	0,41	< LOQ – 5,36
Likopsamīna- <i>N</i> -oksīds	3	4,31	1,04	< LOQ – 10,88
Senecifilīns	2	0,51	0,51	< LOQ – 0,59
Integerimīns	2	1,10	1,10	< LOQ – 1,42
Senecionīns	2	1,50	1,50	< LOQ – 1,50
Ehimidīns	9	1,33	0,48	< LOQ – 3,89
Citie*	-	-	-	< LOQ

\* *ehimidīna-*N*-oksīds, eiropīns, eiropīna-*N*-oksīds, heliosupīns, heliosupīna-*N*-oksīds, heliotrīns, heliotrīna-*N*-oksīds, integerimīna-*N*-oksīds, lasiokarpīns, lasiokarpīna-*N*-oksīds, retrorsīns, retrorsīna-*N*-oksīds, senecionīna-*N*-oksīds, senecifilīna-*N*-oksīds, senecivernīns, senecivernīna-*N*-oksīds, senkirkīns, usaramīns*

Kopējais alkaloīdu saturs konkrētos paraugos ir no LOQ līdz 52,75 µg/kg (3. tabula).

Šobrīd maksimāli pieļaujamā PA satura norma medum nav noteikta, tāpēc rezultātu salīdzinājumu ar maksimāli pieļaujamo saturu nav iespējams veikt.

Analīžu rezultāti ir sniegti 4. tabulā:

## PA un to N-oksīdu iegūtie rezultāti medū

Ražotājs	Nosaukums	Intermedīns	Likopsamīns un Indicīns	Ehinatīns	Ehinatīna-N- oksīds	Indicīna-N-oksīds un Intermedīna- N-oksīds	Likopsamīna-N- oksīds	Senecifiļīns	Integerimīns	Senecionīns	Ehimicīns
SIA "VINNIS"	Medus	0,45	0,66					0,43		1,49	3,42
SIA "Puratos Latvia"	Meds										
SIA "Deiva"	Ziedu medus										
Liepkalni	Ziedu medus	0,49	0,19	1,68							0,35
SIA "VINNIS"	Latvijas ziedu medus										
SIA "VINNIS"	Griķu ziedu medus										0,14
SIA "VINNIS"	Liepziņu medus										
SIA "VINNIS"	Krēmveida medus	0,53	0,71					0,59		1,50	3,89
ZS KALNA SMĪDES 1	Meža ziedu medus										
ZS KALNA SMĪDES 1	Griķu-amoliņa ziedu medus										
SIA "Deiva"	Ziedu medus										
Biškopis: Linars Jankevics	Dažādu ziedu medus										
ZS Jaunspieķi	Medus ar ingveru un citronu										
SIA "VINNIS"	Medus										
Ēberliņu drava	Dažādu ziedu medus										
SIA "Green Hive"	Medus "Kafija"								1,42		
SIA "Green Hive"	Medus "Pīlādzis"										
SIA "Deiva"	Ziedu medus										
SIA "Green Hive"	Medus "Klasiska"	0,27		2,32	8,40						



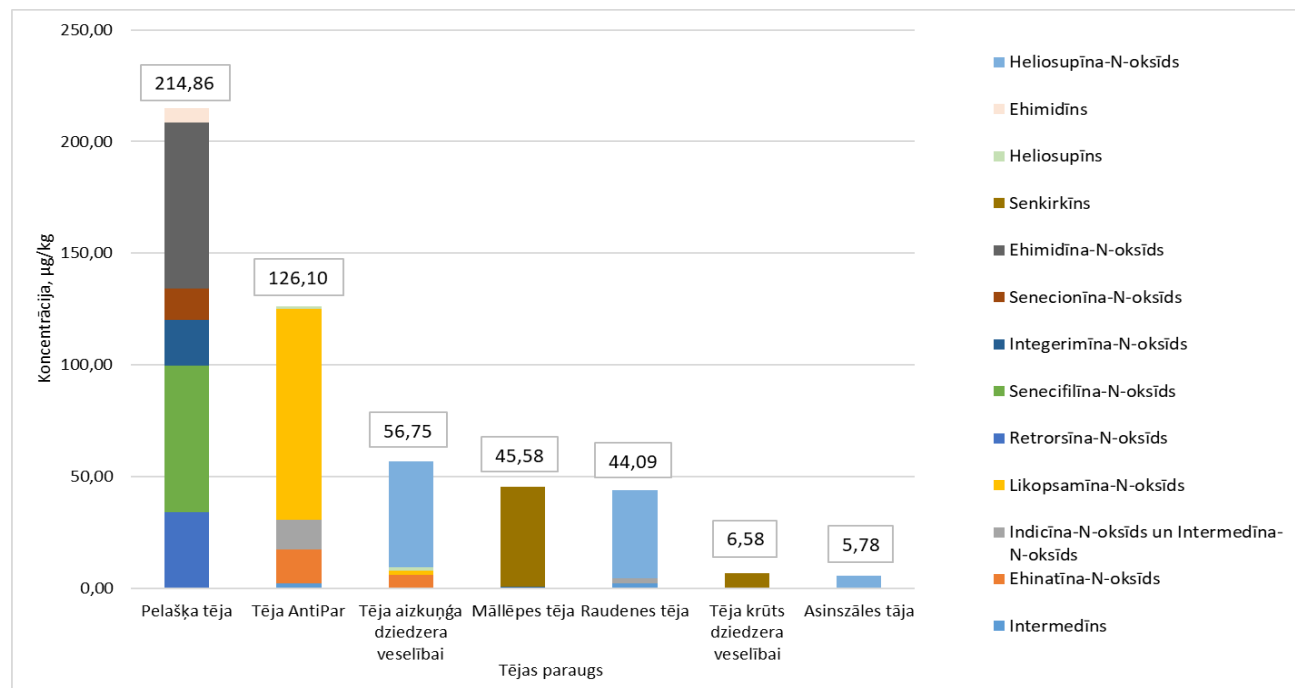
## 4. tabulas turpinājums

Ražotājs	Nosaukums	Intermedīns	Likopsamīns un Indicīns	Ehinatīns	Ehinatīna-N- oksīds	Indicīna-N-oksīds un Intermedīna- N-oksīds	Likopsamīna-N- oksīds	Senecifilīns	Integerimīns	Senecionīns	Ehimidīns
SIA "Green Hive"	Medus "Lācītis"										0,48
Egita Miķelsone	Dažādu ziedu medus				9,84	0,41	1,00				0,29
Z/S "Vāliņi"	Dažādu ziedu medus								0,79		
Liepkalni	Ziedu medus										
"Podi", Veronika Pupiņa	Medus										
-	Meža ziedu vasaras	0,46	0,76	3,95	52,75	5,36	10,88				
biškopis: Dzintars Kreicbergs	Dažādu ziedu medus										
biškopis: Uldis Zikmanis	Dažādu ziedu medus										
Z/S "Ķerpīši"	Dažādu ziedu medus		0,16		1,35	0,41	1,04				0,97
Z/S "Jātnieki"	Dažādu ziedu medus										
Z/S "Dzilnas"	Medus										0,32
Z/S "Norēni"	Dažādu ziedu medus										
biškopis: Olga Vabeļa	Medus										
-	Medus										
J.Larsena	Teteru medus, Vasaras ziedu										2,12
SIA "Ādažu medus"	Ādažu Medus										
biškope Ilze Grava-Niķe	Ziedu medus										
biškope Ilze Grava-Niķe	Meža ziedu medus										

-	Medus
Z/S "Spulgas"	Dažādu ziedu medus
biškope: Aija Lodiņa	Dažādu ziedu medus

---

## Zāļu tējas paraugi



### 4. att. PA iegūtie rezultāti Latvijas izcelsmes tējās

4. attēlā ir attēloti tikai tie paraugi un savienojumi, kuriem bijī detektēti PA savienojumi. Projekta ietvaros tika analizētas 15 zāļu tējas, no kurām 47% bija detektētas pirolizidīna alkaloīdu koncentrācijas virs LOQ.

Tējas paraugos tika konstatēti sekojoši pirolizidīna alkaloīdi un tie *N*-oksīdi: intermedīns, ehinatīna-*N*-oksīds, indicīna-*N*-oksīds un intermedīna-*N*-oksīds, likopsamīna-*N*-oksīds, retrosīna-*N*-oksīds, senecifilīna-*N*-oksīds, integerimīna-*N*-oksīds, senecionīna-*N*-oksīds, ehimidīna-*N*-oksīds, senkirkīns, heliosupīns, ehimidīns, heliosupīna-*N*-oksīds. Visbiežāk tējas paraugos ir sastopams heliosupīna-*N*-oksīds, bet vismazāk – ehimidīns un to oksīds, retrosīna-*N*-oksīds, senecifilīna-*N*-oksīds, senecionīna-*N*-oksīds. Vislielākā PA summa tiek novērota pelašķa tējai, kas ir 214,86 µg/kg, savukārt, viszemākā PA summa ir detektēta asinszāles tējai, kas ir 5,78 µg/kg. Ehimidīna-*N*-oksīda koncentrācija pelašķa tējā ir 34,6% no PA summas paraugā, kas ir 74,24 µg/kg, bet senecifilīna-*N*-oksīda koncentrācija ir 65,64 µg/kg, kas ir 30,6% no PA summas.

Izvērtējot iegūtos rezultātus, var redzēt, ka tējas paraugos pirolizidīna alkaloīda *N*-oksīda detektēti lielākā koncentrācijā salīdzinājumā ar pašiem alkaloīdiem, t.i. 69% *N*-oksīda ir konstatēti no visiem detektētiem PA savienojumiem, kuriem koncentrācija ir lielāka par LOQ.

### Kopsavilkums par PA saturu tējās

PA	Paraugu skaits	Vidējā koncentrācija, µg/kg	Mediāna, µg/kg	Min. – Max. saturs, µg/kg
Intermedīns	2	2,19	2,19	< LOQ – 2,22
Ehinatīna- <i>N</i> -oksīds	2	10,53	10,53	< LOQ – 15,12
Indicīna- <i>N</i> -oksīds un Intermedīna- <i>N</i> -oksīds	2	7,76	7,76	< LOQ – 13,20
Likopsamīna- <i>N</i> -oksīds	2	48,37	48,37	< LOQ – 94,75
Retrorsīna- <i>N</i> -oksīds	1	33,95	33,95	< LOQ – 33,95
Senecifilīna- <i>N</i> -oksīds	1	65,64	65,64	< LOQ – 65,64
Integerimīna- <i>N</i> -oksīds	2	10,59	10,59	< LOQ – 20,45
Senecionīna- <i>N</i> -oksīds	1	14,21	14,21	< LOQ – 14,21
Ehimidīna- <i>N</i> -oksīds	1	74,24	74,24	< LOQ – 74,24
Senkirkīns	2	25,71	25,71	< LOQ – 44,85
Heliosupīns	2	1,13	1,13	< LOQ – 1,40
Ehimidīns	1	6,37	6,37	< LOQ – 6,37
Heliosupīna- <i>N</i> -oksīds	3	30,91	39,54	< LOQ – 47,41
Citie*	-	-	-	< LOQ

\* *ehinatīns, eiropīns, eiropīna-N-oksīds, heliotrīns, heliotrīna-N-oksīds, indicīns, integerimīns, lasiokarpīns, lasiokarpīna-N-oksīds, likopsamīns, retrorsīns, senecionīns, senecifilīns, senecivernīns, senecivernīna-N-oksīds, usaramīns*

Kopējais alkaloīdu saturs paraugos svārstījās no LOQ līdz 94,75 µg/kg (5. tabula).

Šobrīd tiek izskatīts Eiropas Komisijas projekts, kurā ir noteiktas maksimāli pieļaujamas PA koncentrācijas summas 21 pirrolizidīna alkaloīdam\*:

- tēja paciņās vai bez taras, ko izmanto tējas pagatavošanai – 200 µg/kg;
  - rojbuša, anīsa, citronu balzāma, kumelītes, timiāna, piparmētras, citronu verbenas tēja – 400 µg/kg;
  - ārstniecības gurķenes, lupstāja, majorāna un raudenes tēja – 1000 µg/kg.

\* *Intermedīns, Intermedīna-N-oksīds, likopsamīns, likopsamīna-N-oksīds, senecionīns, senecionīna-N-oksīds, senecivernīns, senecivernīna-N-oksīds, senecifilīns, Senecifilīna-N-oksīds, retrorsīns, Retrorsīna-N-oksīds, Ehimidīns, Ehimidīna-N-oksīds, lasiokarpīns, lasiokarpīna-N-oksīds, Senkirkīns, eiropīns, eiropīna-N-oksīds, heliotrīns, heliotrīna-N-oksīds.*

Salīdzinot iegūtus rezultātus ar EK maksimāli pieļaujamām normām, var secināt, ka pelašķa tējai PA summa ir 194,41 µg/kg, kas ir tuvu 200 µg/kg.

Analīžu rezultāti ir sniegti 6. tabulā.

## PA un to N-oksīdu iegūtie rezultāti tējās

Ražotājs	Nosaukums	Intermedīns	Ehinatīna-N-oksīds	Indicīna-N-oksīds un Intermedīna-N- Likopsamīna-N- oksīds	Retrorsīna-N-oksīds	Senecifilīna-N- oksīds	Integerimīna-N- oksīds	Senecionīna-N- oksīds	Ehimidīna-N-oksīds	Senkirkīns	Heliosupīns	Ehimidīns	Heliosupīna-N- oksīds
AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Kumelītes tēja												
AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Kliņģerītes tēja												
AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Liepu ziedu tēja												
AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Piparmētras tēja												
AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Asinszāles tēja												5,78
AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Pelašķa tēja				33,95	65,64	20,45	14,21	74,24			6,37	
AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Māllēpes tēja						0,73			44,85			
ZS "Rūķīšu tēja"	Raudenes tēja	2,22		2,32									39,54
ZS "Rūķīšu tēja"	Ugunspuķes tēja												
ZS "Rūķīšu tēja"	Melisas tēja												
SIA "Inovatīvo biomedicīnas tehnoloģiju institūts"	Tēja vairogdziedzera veselībai												
SIA "Inovatīvo biomedicīnas tehnoloģiju institūts"	Tēja krūts dziedzera veselībai									6,58			
SIA "Inovatīvo biomedicīnas tehnoloģiju institūts"	Tēja AntiPar	2,16	15,12	13,20	94,75						0,87		
SIA "Inovatīvo biomedicīnas tehnoloģiju institūts"	Tēja DIAB												
SIA "Inovatīvo biomedicīnas tehnoloģiju institūts"	Tēja aizkuņģa dziedzera veselībai		5,94		2,00						1,40		47,41

## Piena un tinktūras paraugi

Piena un tinktūras gadījumā PA netika konstatēti. Pētījumā iekļautie paraugi ir norādīti 7. tabulā:

7. tabula

**Piena un tinktūras paraugu saraksts**

Piens		Tinktūras	
Ražotājs	Nosaukums	Ražotājs	Nosaukums
AS "Rīgas piena kombināts"	Pasterizēts piens Valmiera 2,5%	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Kliņģerītes tinktūra
AS "Tukuma Piens"	Piens 2%	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Māteres tinktūra
SIA "Abrās"	Pasterizēts piens 2%	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Sirds pilieni
AS "Tukuma Piens"	Ekoloģiskis piens 2%	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Piparmētras tinktūra
AS "Lazdonas Piensaimnieks"	Pasterizēts kafijas piens 5,5%	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Eikalipta tinktūra
AS "Rīgas piena kombināts"	Limbažu piens 2,5%	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Baldriāna tinktūra
AS "Talsu piensaimnieks"	Talsu piens 2,5%	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Vērmeles tinktūra
SIA "Zemturi ZS"	Nepasterizēts svaigpiens 3,6%	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Kuņģa pilieni
AS "Lazdonas Piensaimnieks"	Karsēts piens ar paaugstinātu olbaltumvielu saturu 4%	SIA "Silvanols"	LaringoSpray ar kliņģerītēm un propolisu
AS "Lazdonas Piensaimnieks"	Pasterizēts piens 2,5%	SIA "Homeopātija"	Chelidonium D1 dil. (strutene)
		SIA "Homeopātija"	Plantago D1 dil. (ceļteka)
		SIA "Homeopātija"	Hypericum D1 dil. (asinszāle)

## Kvantificēšanas robežas

LOQ (kvantitatīvās noteikšanas robeža) tika definēta kā koncentrācija paraugā, pie kuras smailes signāla un trokšņa attiecība  $\geq 10$ , un tā tika novērtēta, veicot atkārtotu tukšo paraugu analīzi ar dažādu koncentrāciju standartpiedevām (8. tabula).

8. tabula

### Kvantificēšanas robežas (LOQ)

Savienojums	LOQ, $\mu\text{g}/\text{kg}$			
	Medus	Tējas	Tinktūras	Piens
Intermedīns	0,15	2,1	6,6	0,25
Likopsamīns un Indicīns	0,15	1,8	5,4	0,14
Ehinatīns	1,2	2,9	0,80	0,66
Ehinatīna- <i>N</i> -oksīds	1,1	5,8	3,3	1,1
Indicīna- <i>N</i> -oksīds un Intermedīna- <i>N</i> -oksīds	0,40	4,6	0,29	0,50
Likopsamīna- <i>N</i> -oksīds	0,85	4,4	2,5	0,77
Senecifilīns	0,35	3,6	8	0,29
Integerimīns	0,25	20	3	0,23
Senecionīns	0,20	7,5	3	0,21
Ehimidīns	0,095	0,60	8	0,092
Ehimidīna- <i>N</i> -oksīds	0,33	1,9	0,58	0,32
Eiropīns	0,29	2,6	0,40	0,25
Eiropīna- <i>N</i> -oksīds	0,57	7,5	8,8	0,54
Heliosupīns	0,088	0,75	10	0,097
Heliosupīna- <i>N</i> -oksīda	0,36	3,4	1,8	0,33
Heliotrīns	0,10	0,95	0,32	0,14
Heliotrīna- <i>N</i> -oksīds	0,33	2,3	10	0,33
Integerimīna- <i>N</i> -oksīds	0,66	5,5	9	0,74
Lasiokarpīns	0,050	0,52	6	0,027
Lasiokarpīna- <i>N</i> -oksīds	0,13	0,85	4,1	0,10
Retrorsīns un Usaramīns	0,89	3,7	1,4	0,22

Savienojums	LOQ, µg/kg			
	Medus		Medus	
Retrorsīna- <i>N</i> -oksīds	2,5	13	5,5	1,1
Senecionīna- <i>N</i> -oksīds	0,62	4,5	8	0,37
Senecifilīna- <i>N</i> -oksīds	1,1	5,7	3,3	0,57
Senecivernīns	0,27	8,4	3	0,29
Senecivernīna- <i>N</i> -oksīds	1,3	11	8	0,49
Senkirkīns	0,11	1,2	0,41	0,50

### Metodes nenoteiktība

Paplašinātā mērījumu nenoteiktība (pie 95% ticamības intervāla) tika novērtēta, veicot atkārtotus mērījumus paraugiem ar standartpiedevu kvantificēšanas robežas tuvumā un aprēķinot relatīvo standartnovirzi no mērījumu rezultātu atgūstamības.

Visu nosakāmo savienojumu vidējā paplašinātā nenoteiktība ir 18% medus paraugiem, 20% piena paraugiem, 30% tēju paraugiem, 17% tinktūru paraugiem.

Visu nosakāmo savienojumu novērtētās nenoteiktības ir robežās no 6% līdz 32% medus paraugiem, no 8% līdz 46% piena paraugiem, no 9% līdz 50% tēju paraugiem, no 7% līdz 35% tinktūru paraugiem. Novērtētās nenoteiktības ir parādītas 9. tabulā.

9. tabula

### Analītiskās metodes nenoteiktība

Savienojums	Medus	Piens	Tēja	Tinktūras
Ehimidīns	19%	17%	9%	33%
Ehimidīna <i>N</i> -oksīds	24%	46%	47%	15%
Ehinatīns	28%	18%	27%	21%
Ehinatīna <i>N</i> -oksīds	20%	17%	25%	11%
Eiropīns	22%	27%	46%	12%
Eiropīna <i>N</i> -oksīds	32%	9%	24%	9%
Heliosupīns	18%	16%	29%	28%
Heliosupīna <i>N</i> -oksīds	28%	41%	50%	7%
Heliotrīns	7%	11%	20%	8%
Heliotrīna <i>N</i> -oksīds	14%	10%	20%	34%
Indicīna <i>N</i> -oksīds un Intermedīna <i>N</i> -oksīds	17%	24%	34%	23%



## 9. tabulas turpinājums

Savienojums	Medus	Piens	Tēja	Tinktūras
Integerimīns	6%	13%	20%	10%
Integerimīna <i>N</i> -oksīds	12%	27%	24%	10%
Intermedīns	25%	19%	31%	20%
Lasiokarpīns	10%	35%	37%	35%
Lasiokarpīna <i>N</i> -oksīds	14%	13%	20%	7%
Likopsamīns un Indicīns	20%	18%	36%	32%
Likopsamīna <i>N</i> -oksīds	17%	14%	36%	8%
Retrosīna <i>N</i> -oksīds	19%	13%	17%	15%
Senecionīns	6%	23%	38%	17%
Senecionīna <i>N</i> -oksīds	10%	32%	29%	28%
Senecifilīns	16%	8%	21%	17%
Senecifilīna <i>N</i> -oksīds	22%	13%	20%	21%
Senecivernīns	20%	20%	46%	13%
Senecivernīna <i>N</i> -oksīds	30%	21%	43%	9%
Senkirkīns	20%	37%	43%	9%
Usaramīns un Retrosīns	8%	10%	16%	16%

## SECINĀJUMI

1. Pētījuma ietvaros tika izstrādāta analītiskā metode pirrolizidīna alkaloīdu un to *N*-oksīdu noteikšanai, izmantojot nanoplūsmas šķidrums hromatogrāfiju un elektroizsmidzināšanas jonizācijas augstas izšķirtspējas masspektrometriju.
2. Tika sasniegti sekojoši metodes raksturparametri – linearitāte > 0,95, ekstrakcijas atgūstamība 57% - 111% medus gadījumā un 42% - 126% tējas gadījumā, LOD no 0,0081 µg/kg līdz 6 µg/kg, LOQ no 0,027 µg/kg līdz 20 µg/kg un metodes nenoteiktība no 6% līdz 50%.
3. Tika analizēti 80 paraugi – augu tējas, augu uzlējumi, medus un piens. Lielākā konstatētā koncentrācija ir raksturīga likopsamīna-*N*-oksīdam, kas ir 94,75 µg/kg. Visbiežāk ir sastopami šādi PA – ehimidīns, intermedīns, likopsamīns un indicīns medū, heliosupine-*N*-oksīds tējās.
4. Iegūto koncentrāciju salīdzinājums ar EK maksimāli pieļaujamo koncentrāciju projektu liecina, ka nevienā paraugā plānotā PA satura norma netika pārsniegta.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Celano, R.; Piccinelli, A. L.; Campone, L.; Russo, M.; Rastrelli, L. Determination of Selected Pyrrolizidine Alkaloids in Honey by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, 8689-8699, 31.
2. Wang, T.; Frandsen, H. L.; Christiansson, N. R.; Rosendal, S. E.; Pedersen, M.; Smedsgaard, J. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Quantification with and without standards. *Food Control* **2019**, 227-237.
3. Martinello, M.; Borin, A.; Stella, R.; Bovo, D.; Biancotto, G.; Gallina, A.; Mutinelli, F. Development and validation of a QuEChERS method coupled to liquid chromatography and high resolution mass spectrometry to determine pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey. *Food Chemistry* **2017**, 295-302.
4. Bodi, D.; Ronczka, S.; Gottschalk, C.; Behr, N.; Skibba, A.; Wagner, M.; Lahrssen-Wiederholt, M.; Preiss-Weigert, A.; These, A. Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2014**, 1886-1895, 11.
5. Sixto, A.; Niell, S.; Heinzen, H. Straightforward Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey through Simplified Methanol Extraction (QuPPE) and LC-MS/MS Modes. *ACS Omega* **2019**, 22632-22637, 27.
6. Ewelina, K.; Krzysztof, K. Pyrrolizidine alkaloids in honey: determination with liquid chromatography-mass spectrometry method. *Journal of Veterinary Research* **2018**, 173-181, 2.
7. Oplatowska, M.; Elliott, C. T.; Huet, A.-C.; McCarthy, M.; Mulder, P. P. J.; von Holst, C.; Delahaut, P.; Van Egmond, H. P.; Campbell, K. Development and validation of a rapid multiplex ELISA for pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, 757-770, 3.
8. De Jesus Inacio, L.; Merlanti, R.; Lucatello, L.; Bisutti, V.; Contiero, B.; Serva, L.; Segato, S.; Capolongo, F. Pyrrolizidine alkaloids in bee pollen identified by LC-MS/MS analysis and colour parameters using multivariate class modeling. *Heliyon* **2020**, 3.
9. Bolechová, M.; Čáslavský, J.; Pospíchalová, M.; Kosubová, P. UPLC–MS/MS method for determination of selected pyrrolizidine alkaloids in feed. *Food Chemistry* **2015**, 265-270.

## **PIELIKUMS**

**Literatūrā aprakstītās PA noteikšanas analīzes metodes**

Nr.	Aparāts	Kolonna	Reproducējamība, %	Atkārtojamība, %	Atgūstamība, %	LOQ (LOD), µg/kg	SPE attīrīšana
1.	Agilent 1200 HPLC ar Bruker Daltonics micro- TOFq MS	Nucleoshell C18 reversed-phase column	6,3 - 21,6	2,6 - 18,9	79,2 - 104,4	0,5 - 1,3 (0,2 - 0,6)	150 mg/6 mL, Biotage Evolute Express CX
2.	Agilent HP 1200 ar Single quadrupole MS	Germini NX-C18; C18 guard column	4,9 - 17,7	2,3 - 14,6	80,6 - 114,5	1,0 - 1,7 (-)	Oasis MCS 500 mg/6 mL
3.	Shimadzu Nexera X2 UHPLC ar Qtrap 6500 MS	Luna Omega Polar C18	1,0 - 12,0	4,0 - 11,0	60,5 - 102,6	0,03 - 0,06 (-)	Oasis MCX 150 mg
4.	Thermo Scientific Accela ar TSQ Vantage	Hypersil Gold C18	-	1,0 - 20,0	72,0 - 122,0	0,18 - 5,9 (0,06 - 2,0)	HF Bond Elut LRC- SCX 500 mg/10 mL
5.	UltiMate 3000 ar hybrid quadrupole-Orbitrap MS	Ascentis Express C8	1,1 - 15,6	0,9 - 15,1	96,0 - 114,8	0,1 - 0,7 (0,04 - 0,2)	Neizmanto
6.	Waters Acquity UPLC ar TQ.Xevo	Acquity BEH C18	-	-	72,0 - 95,0 0,8)	5 (0,2 - 0,8)	Neizmanto
7.	Agilent 1290 ar QTrap 5500	ZORBAX C18	1,6 - 10,2	1,4 - 10,2	95,0 - 110,0 (0,1 - 1)	0,2 - 1,5 (0,1 - 1)	Neizmanto
8.	Accela 600 ar LTQ.XL ion trap MS	Hypersil Gold C18	1,1 - 13,2	2,4 - 14,3	80,0 - 120,0	0,4 (-)	Bond Elut Piexa PCX 200 mg/6 mL