

Pyrrrolizidinové alkaloidy

Tereza Hrbáčová

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav chemie

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Tereza Hrbáčová
Osobní číslo: T20548
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace: Chemie a analýza potravin
Forma studia: Kombinovaná
Téma práce: Pyrrolizidinové alkaloidy

Zásady pro vypracování

Zpracovat literární rešerši se zaměřením na:

- nejvýznamější zástupce skupiny pyrrolizidinových alkaloidů
- výskyt této skupiny látek v přírodních zdrojích (rostlinách)
- fyzikálně-chemické vlastnosti, biosyntézu, toxicitu pyrrolizidinových alkaloidů
- výskyt v potravinách
- možnosti stanovení pomocí analytických metod

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Brugnerotto, P. et al.: Pyrrolizidine alkaloids and beehive products: A review. Food Chem. 2022, 390, 128384.
2. Han, H. et al.: Dissipation pattern and conversion of pyrrolizidine alkaloids (PAs) and pyrrolizidine alkaloid N-oxides (PANOs) during tea manufacturing and brewing. Food Chem. 2022, 390, 133183.
3. Chen, Y. et al.: Rapid identification and determination of pyrrolizidine alkaloids in herbal and food samples via direct analysis in real-time mass spectrometry. Food Chem. 2021, 334, 127472.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce si klade za cíl poskytnout souhrnné informace týkající se zajímavé skupiny sloučenin souhrnně označovaných jako pyrrolizidinové alkaloidy. Po stručné charakteristice této skupiny látek, je věnována pozornost možnostem jejich biosyntézy, metabolických přeměn a popisu vybraných zástupců této skupiny alkaloidů. Dále je věnována pozornost jejich toxicitě, nejen se zaměřením se na popis potvrzených případů hromadných otrav, ale také na vliv toxicity vůči různým živočišným druhům. Obavy z otravy pyrrolizidinovými alkaloidy se, s ohledem na relativně vysokou pravděpodobnost kontaminace potravin, jeví jako oprávněné. Na druhou stranu, někteří zástupci této rodiny látek vykazují zajímavé biologické účinky, což otevírá dveře směrem k jejich možnému budoucímu využití v oblasti medicínální chemie. Velmi důležitou oblastí, která rovněž není ponechána stranou, je analytické stanovení pyrrolizidinových alkaloidů pomocí moderních spektrálních metod.

Klíčová slova: pyrrolizidinové alkaloidy, potraviny, toxicita, biologická aktivita, metody strukturní analýzy

ABSTRACT

The submitted bachelor thesis aims to provide summary information regarding interesting group of compounds collectively referred to as pyrrolizidine alkaloids. After a brief characterization of this group of substances, attention is paid to the possibilities of their biosynthesis, metabolic transformations and description of selected representatives of this group of alkaloids, respectively. Attention is also paid to their toxicity, not only focusing on the description of confirmed cases of mass poisonings, but also to the effect of toxicity to different animal species. Concerns about poisoning with pyrrolizidine alkaloids appear to be justified, considering the relatively high probability of food contamination. On the other hand, some representatives of this family of substances show interesting biological effects, opening the door to their possible future use in the field of medical chemistry. A very important area, which is also not left out, is the analytical determination of pyrrolizidine alkaloids using modern spectral methods.

Keywords: pyrrolizidine alkaloids, food, toxicity, biological activity, structural analysis methods

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za odborné vedení, za jeho čas a cenné rady při zpracování bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
1 CHARAKTERISTIKA PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	10
1.1 BIOSYNTÉZA PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	12
1.1.1 Metabolizace pyrrolizidinových alkaloidů u hmyzu.....	17
1.2 VYBRANÍ ZÁSTUPCI PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	18
1.2.1 Senecionin	18
1.2.2 Echimidin	19
1.2.3 Retrorsin	20
1.2.4 Laziokarpin	20
1.2.5 Klivorin	21
1.2.6 Monokrotalin.....	21
1.2.7 Platyfylin	22
2 TOXICITA PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	23
2.1 HISTORICKÉ PŘÍPADY OTRAV	24
2.2 MEZIDRUHOVÉ ROZDÍLY V NÁCHYLNOSTI NA TOXICKÉ ÚČINKY PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	26
3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ.....	27
3.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA.....	27
3.2 PROTIZÁNĚTLIVÁ AKTIVITA	28
3.3 PROTINÁDOROVÁ AKTIVITA	31
4 VÝSKYT PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ	33
4.1 VÝSKYT V ROSTLINÁCH	33
4.1.1 <i>Senecio</i>	33
4.1.2 <i>Echium</i>	34
4.1.3 <i>Crotalaria</i>	34
4.1.4 <i>Eupatorium</i>	35
4.1.5 <i>Heliotropium</i>	36
4.1.6 <i>Liparis</i>	36
4.2 VÝSKYT V POTRAVINÁCH	39
4.2.1 Med	40
4.2.2 Čaj a bylinný čaj.....	41
4.2.3 Doplnky stravy	42
4.2.4 Živočišné produkty.....	43
4.2.5 Limity pyrrolizidinových alkaloidů v potravinách	46
5 MOŽNOSTI STANOVENÍ PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ.....	47
5.1 EXTRAKCE Z POTRAVINÁŘSKÉ MATRICE	47
5.1.1 Příprava vzorku	47
5.1.2 Extrakce.....	48
5.1.3 Purifikace	49

5.2	SEPARACE A IDENTIFIKACE	49
5.2.1	Odstředivá protiproudá separace	50
5.2.2	Vysoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií	51
5.2.3	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií	52
5.2.4	Nukleární magnetická rezonance	53
5.2.5	Imunologické metody.....	54
5.2.6	Hmotnostní spektrometrie	55
5.2.7	Spektrofotometrie.....	56
6	VÝHLED DO BUDOUCNA.....	57
	ZÁVĚR	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
	SEZNAM TABULEK.....	82

ÚVOD

Alkaloidy představují dusíkaté, zásadité reagující sekundární metabolity, které jsou produkovány převážně rostlinami, dále také houbami či některými živočichy např. obojživelníky. Jejich role v rostlinách dosud není zcela objasněna, ale je pravděpodobné, že slouží jako ochrana rostlin před parazity a býložravci, [1] jelikož jsou hořké a toxické. Další možnost je, že se jedná pouze o odpadní látky metabolismu. Pro člověka je spousta z nich v různé míře toxická, avšak některé vykazují v nízkých koncentracích zajímavé biologické účinky. Alkaloidy se tvoří při přeměně aminokyselin (AK), jsou lipofilní a v rostlinách se zpravidla vyskytují ve formě solí karboxylových kyselin.

Společným strukturním motivem pyrrolizidinových alkaloidů (PA) je přítomnost heterocyklické sloučeniny, zvané pyrrolizidin. Jejich součástí je rovněž kyselina necinová, která je odvozena od AK s rozvětveným řetězcem. [1] PA představují druhově rozšířenou třídu heterocyklických organických sloučenin, kdy se jedná přibližně o 600 typů látek, nacházejících se přibližně ve 3 % kvetoucích rostlin. [2]

Složení rostlin skýtá velmi širokou škálu sloučenin, a to jak organických (proteiny, lipidy, chlorofyl, enzymy a aminokyseliny), tak anorganických (minerální látky), které jsou nezbytnými primárními metabolity pro fyziologické funkce a jsou velmi důležité pro vývoj rostliny. Zároveň také rostliny během evoluce vyvinuly širokou škálu sekundárních metabolitů produkovaných při obraně proti býložravcům či mikroorganismům. [3]

Mezi sekundární metabolity patří, vyjma tříslovin, saponinů, glykosidů, flavonoidů, steroidů a dalších, také pyrrolizidinové alkaloidy, které jsou produkovány více než 6000 druhy rostlin, se kterými se lze setkat po celém světě, přičemž nejčastěji se vyskytují v rostlinách rodu *Senecio* (starček) [4], *Echium* (hadinec) [5], *Crotalaria* (chřestnatec) [6] a *Eupatorium* (sadec) [7, 8]. Jedná se o nejrozšířenější přírodní fytotoxiny ohrožující zdraví zvířat i lidí. [9]

PA se začala věnovat pozornost již před více než sto lety, kdy představovaly především problém pro zdraví zvířat, ale nedávné nálezy relativně vysokých množství PA v některých lidmi konzumovaných produktech ukázaly, že kontaminace PA je také relevantním tématem pro bezpečnost potravin. [10]

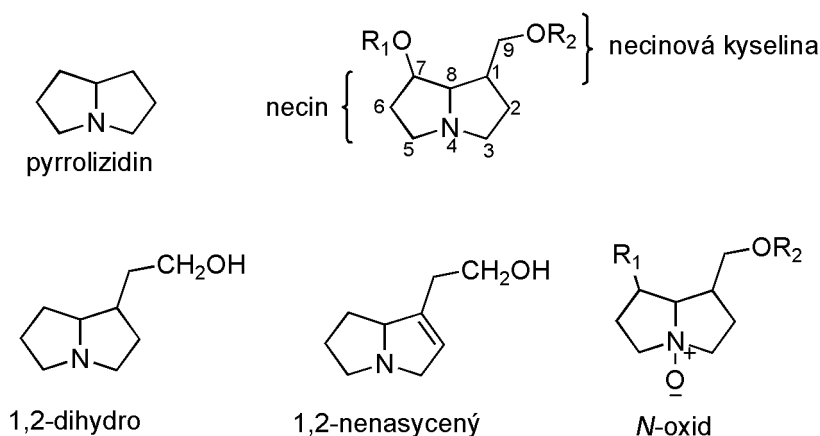
1 CHARAKTERISTIKA PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

Pyrrolizidinové alkaloidy představují z chemického úhlu pohledu estery 1-hydroxymethylpyrrolizidinu a alifatických monokarboxylových, nebo dikarboxylových kyselin. [11] Jedná se o nepolární sloučeniny a jejich společnou chemickou strukturu tvoří dva pyrrolové kruhy spojené atomem dusíku v poloze 4 a další dvě strukturální složky:

- necinová báze – jedná se o aminoalkohol odvozený od pyrrolizidinu, systematicky 7-hydroxy-1-hydroxymethyl-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolizidin
- necinová kyselina – ta je odvozena z aminokyselin s rozvětveným řetězcem, jako je valin, threonin, leucin nebo izoleucin (Obrázek 1). [1]

Jedná se o strukturně velmi rozmanité látky, které se obvykle vyskytují ve dvou formách:

- terciární volná báze,
- pyrrolizidinový alkaloid *N*-oxid (PANO). [12, 13]



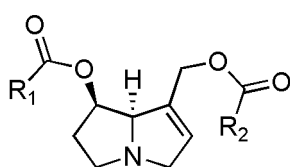
Obrázek 1 Struktura PA a jeho různé formy; R_1 a R_2 odpovídají různým necinovým kyselinám (upraveno dle citace [12]).

Aminoalkoholy nebo neciny jsou odvozeny od pyrrolizidinu, což je heterocyklická sloučenina, která dle chemické struktury představuje klasický terciární amin. [14] Jádro pyrrolizidinu, které se skládá ze dvou nasycených pětičlenných kruhů s atomem dusíku mezi nimi, může mít dvojnou vazbu umístěnou mezi atomy uhlíku C1 a C2, což často vede ke zvýšené toxicitě. [12] Všechny dosud známé PA jsou diestery či monostery, přičemž esterová vazba se vyskytuje nejčastěji v polohách C7 a C9 necinové báze. [15].

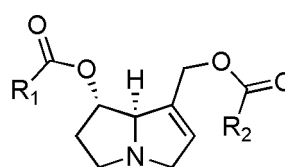
Podle struktury necinové báze se dělí PA do čtyř skupin, a to na retronecinový, heliotridinový, otonecinový a platynecinový typ, [12] jak je patrné z Tabulky 1 a Obrázek 2.

Tabulka 1 Skupiny PA dle struktury necinové báze.

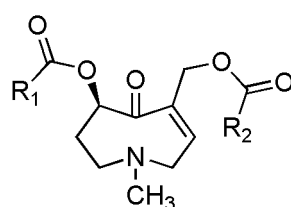
Typ dle struktury necinové báze	Typ báze	Struktura	Konfigurace	Izomerie
<u>retronecinový</u>	nenasyčená	bicyklická	7R	diastereomery (odlišná orientace v poloze C7)
<u>heliotridinový</u>	nenasyčená	bicyklická	7S	
<u>otonecinový</u>	nenasyčená	monocyklická	7R	
<u>platynecinový</u>	nasyčená	bicyklická	7S	



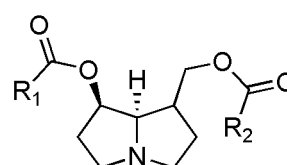
retronecinový typ



heliotridinový typ



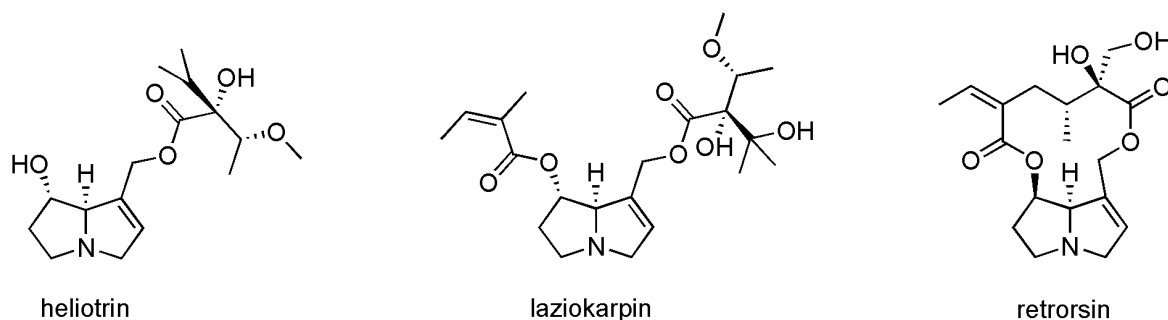
otonecinový typ



platynecinový typ

Obrázek 2 Strukturální vzorce PA dle struktury necinové báze

V závislosti na esterifikaci jedné nebo obou hydroxylových skupin se rozlišují monoestery (např. heliotrin) nebo diestery (např. laziokarpin) PA. Esterifikací dvěma karboxylovými skupinami dikarboxylové kyseliny vzniká cyklický diester (např. retrorsin). [11] Strukturální vzorce výše uvedených sloučenin jsou znázorněny na Obrázek 3.



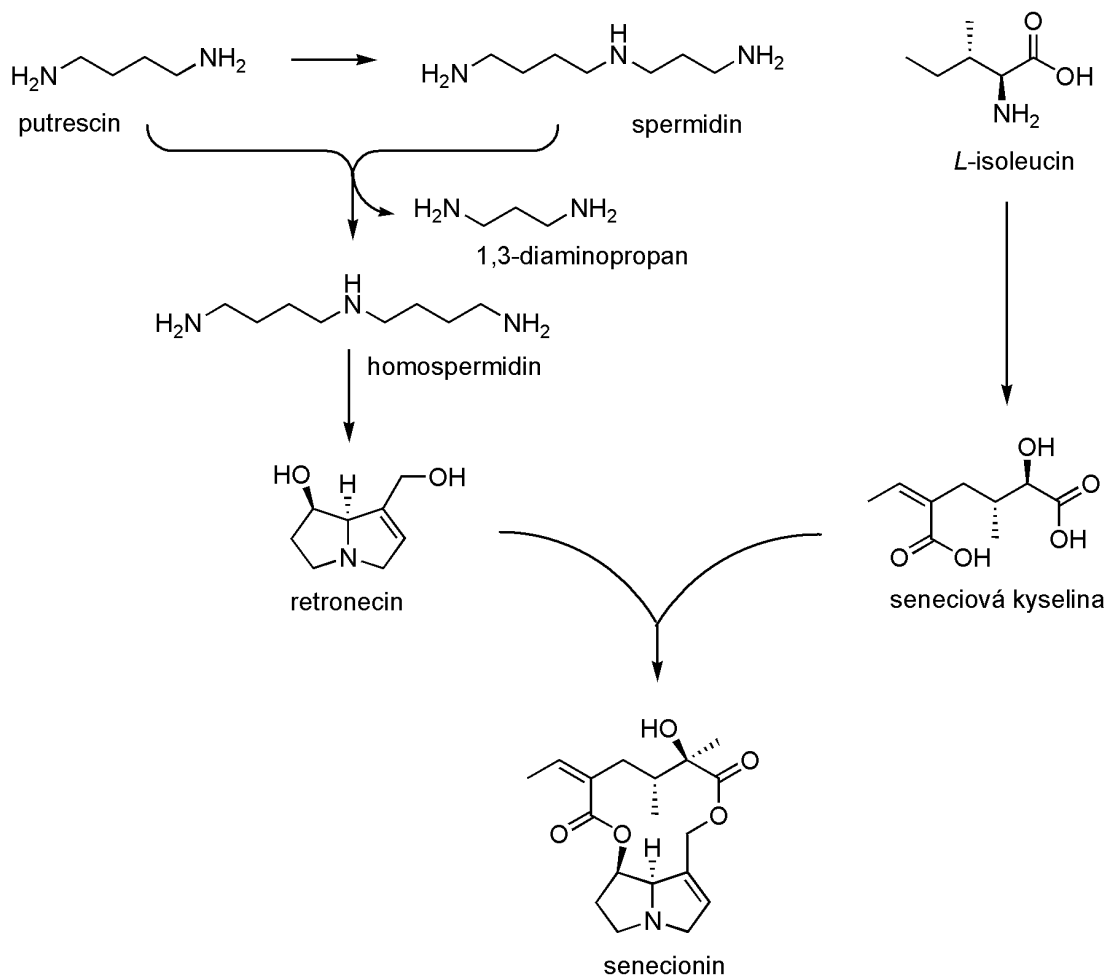
Obrázek 3 Příklady PA s monoesterovou, otevřenou diesterovou a cyklickou diesterovou strukturou.

Dále se PA strukturně rozlišují podle druhu spojení necinové báze s kyselinou necinovou na čtyři skupiny PA:

- monoester s otevřeným řetězcem (např. lykosamin)
- diester s otevřeným řetězcem (např. lasiocarpin)
- 11členný makrocyclický diester (např. monokrotalin)
- 12členný makrocyclický diester (např. senecionin). [16]

1.1 Biosyntéza pyrrolizidinových alkaloidů

PA jsou syntetizovány výhradně rostlinami. [17] Podle studií provedených na *Senecio vulgaris* byly místem, kde byly PA biosyntetizovány kořeny a odtud přemístěny do výhonků a květenství. [18] Bylo zjištěno, že PA samy o sobě jsou biologicky a toxikologicky neaktivní a vyžadují metabolickou aktivaci. V důsledku toho lze očekávat silný vztah mezi aktivačním metabolismem a toxicitou. [10] Nicméně, navzdory jejich významu jakožto toxických kontaminantů zemědělských produktů není dostatek znalostí o jejich biosyntéze. Zatímco byly definovány meziproducty vznikající v průběhu biosyntézy, tak dosud byl charakterizován pouze jeden enzym zapojený do biosyntézy PA, a to homospermidin syntáza katalyzující první biosyntetický krok. [19] Tuto biosyntézu lze vidět na Obrázek 4.



Obrázek 4 Biosyntéza PA (upraveno dle citace [19]).

Toxicitu ve většině případů nezpůsobuje samotný PA, ale reaktivní meziproducty vznikající během metabolické aktivace (jaterního metabolismu).

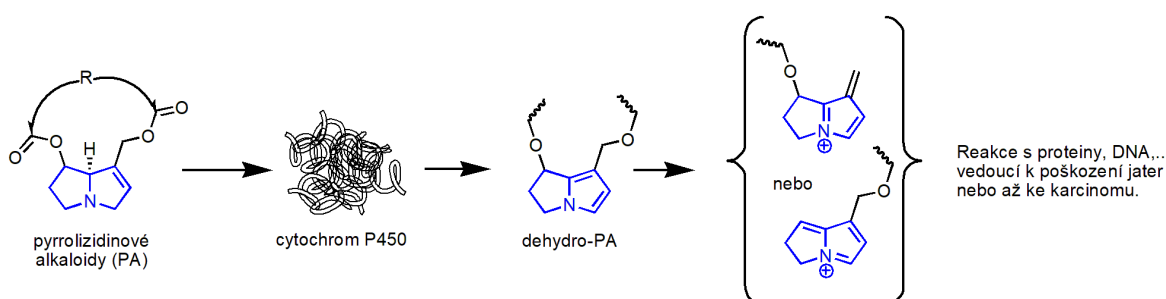
Existují čtyři hlavní metabolické cesty PA:

1. dehydrogenace,
2. oxidace,
3. hydrolýza,
4. *N*-glukuronidace.

Zatímco první tři výše uvedené cesty byly rozsáhle studovány, o čtvrté je toho známo jen velmi málo. [20]

Prvním krokem metabolické aktivace PA po požití a absorpci je dehydrogenace (oxidace) katalyzovaná monooxygenázami cytochromu P450, což je enzym metabolizující

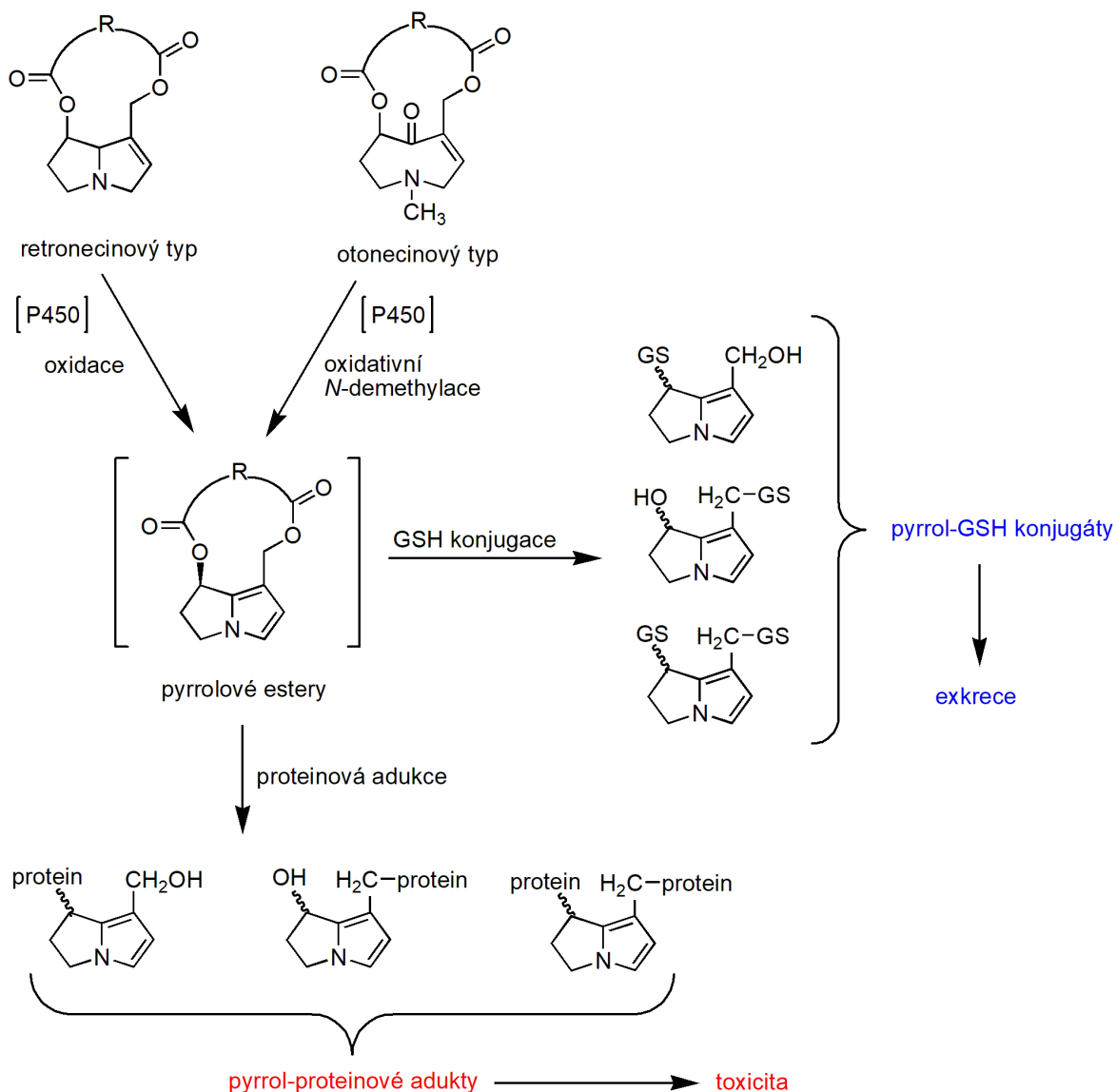
xenobiotika. U PA retronecinového a heliotridinového typu dochází k hydroxylaci necinové báze v poloze C3 a C8 za vzniku derivátů 3- nebo 8-hydroxynecinu s následnou spontánní dehydratací. U PA otonecinového typu dochází k oxidační *N*-demethylaci necinové báze. Následuje uzavření kruhu a dehydratace, během které vznikají vysoce reaktivní metabolity dehydropyrrolizidinu (dehydro PA), známé také jako pyrroly či estery. [19, 21, 22] Ty se dále váží na buněčný protein za vzniku pyrrol-proteinových aduktů, což vede k akutní toxicitě hlavně v játrech a také v dalších orgánech (např. plicích). Tuto aktivaci lze vidět na Obrázek 5. Pyrrolové estery také reagují s DNA za vzniku aduktů typu pyrrol-DNA, které vykazují genotoxicitu. Z důvodu nízké stability nemohou být pyrrolové estery přímo stanoveny, zatímco pyrrol-proteinové adukty jsou v těle relativně stabilní a s jejich stanovením není problém. Pyrrol-proteinových aduktů tvořených PA otonecinového typu je významně méně než u PA retronecinového typu s podobnými necinovými kyselinami. Je to z toho důvodu, že PA otonecinového typu vyžadují další oxidační (*N*-demethylační) krok k vytvoření struktury pyrrolového kruhu před vznikem reaktivního pyrrolového esteru. Tento dodatečný krok biotransformace, nezbytný k vytvoření reaktivního meziprojektu, snižuje celkovou rychlost metabolické aktivace a tvorby pyrrol-proteinových aduktů z otonecinových PA. [23]



Obrázek 5 Hlavní metabolická dráha PA (upraveno dle citace [14]).

Bylo prokázáno, že cytotoxicita vyvolaná PA je snížena v přítomnosti glutathionu (GSH) nebo jeho prekurzorů. [24] Nukleofilní substituce jedné nebo dvou molekul glutathionu produkuje GSH konjugáty, které jsou považovány za detoxikační metabolity. Zároveň ale také působí jako reaktivní metabolity, což způsobuje tvorbu DNA aduktů. GSH konjugace je jednou z nejdůležitějších detoxikačních reakcí PA. Avšak v případě, že jsou hladiny reaktivních meziprojektů dostatečně vysoké, může být buněčná rezerva tohoto antioxidantu vyčerpána, což způsobuje právě poškození jaterních tkání. [19] Schéma jaterní

metabolické aktivace PA retronecinového a otonecinového typu je znázorněno na Obrázek 6.



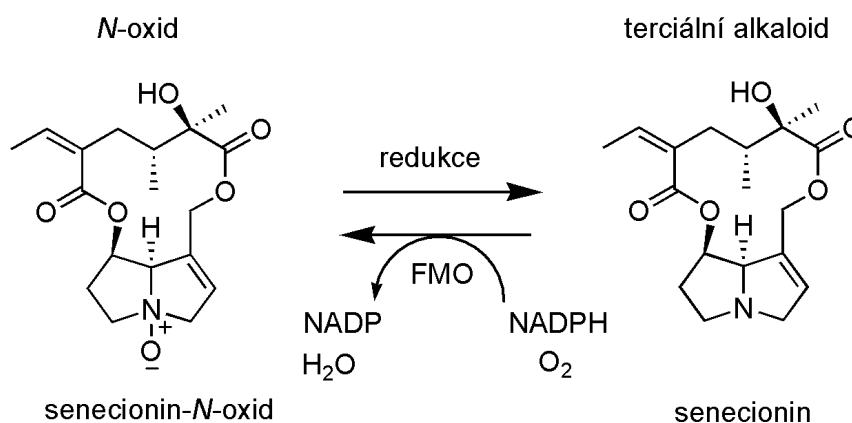
Obrázek 6 Jaterní metabolická aktivace PA retronecinového a otonecinového typu (upraveno dle citace [23]).

Studie realizované na zvířatech ukazují, že PA se po perorálním požití snadno vstřebávají z gastrointestinálního traktu. [25] Většina z nich, asi 80 %, se vylučuje močí, stolicí a mlékem, několik z nich je schopno projít placentou, a to kvůli jejich vysoké lipofilitě. Jak již bylo zmíněno, bioaktivace se vyskytuje většinou v játrech, a proto je tento orgán nejvíce ovlivněn toxicitou. Plíce jsou druhým nejvíce postiženým orgánem, a to kvůli tomu, že pyrroly vytvořené po metabolické aktivaci v játrech mohou být transportovány do plicí krví. [12]

Ukázalo se, že *N*-oxidace, která je katalyzována monooxygenázami, je druhou cestou metabolismu PA u savců. [26] Několik obratlovců je totiž schopno detoxikovat protoxické terciární pyrrolizidinové alkaloidy *N*-oxidací v játrech. Toho jsou schopny například ovce a morčata, které mají v těle enzym flavin monooxygenázu (FMO). Ten přeměňuje požitá PA na jejich polární *N*-oxidy, jež se následně vylučují. [27] Morčata vykazují rovněž vysokou schopnost hydrolytické detoxikace PA. [28] Tato hydrolyza probíhá v pozicích C7 a C9, a je zprostředkována jaterními karboxylesterázami. [29] Z důvodu této detoxikace jsou také morčata, ovce, a také další menší býložravci odolní vůči otravě PA. [30] Příklad *N*-oxidace senecioninu je znázorněn na Obrázek 7. Rozdílné vlastnosti *N*-oxidu a terciálního alkaloidu jsou shrnuty v Tabulka 2.

N-glukuronidace, která hraje důležitou roli při eliminaci a detoxikaci xenobiotik, byla popsána v práci skupiny čínských vědců. Byly zde zjištěny významné druhové rozdíly *N*-glukuronidace PA mezi lidmi a osmi druhy zvířat, přičemž jaterní mikrozomy u lidí, králíků, skotu, ovcí a prasat vykazují významně vyšší glukuronidační aktivitu na PA ve srovnání s morčaty a psy, a dokonce myši a potkani nevykazují žádnou. Pozornost v jejich studii byla věnována především senecioninu. [31]

Lze tedy říci, že dehydrogenační cestou jsou produkovány konečné toxické pyrrolové estery, zatímco *N*-oxidací, hydrolyzou případně *N*-glukuronidací, jsou PA detoxikovány.



Obrázek 7 *N*-oxidace (způsob detoxikace PA), (upraveno dle citace [32]).

Tabulka 2 Rozdíly mezi *N*-oxidem a terciálním alkaloidem. [32]

<i>N</i> -oxid	Terciální alkaloid
hydrofilní	lipofilní
netoxický	toxický po bioaktivaci
metabolicky bezpečný	metabolicky nebezpečný
neschopen pronikat membránami	schopen pronikat membránami

1.1.1 Metabolizace pyrrolizidinových alkaloidů u hmyzu

Některé druhy hmyzu (např. přástevník starčkový nebo blýskavka bavlníková) jsou schopny detoxikovat PA ze své hostitelské rostliny pomocí *N*-oxidace. [26] *N*-oxidací se potenciálně toxické volné báze přeměňují zpět na PANO, které nemohou být transformovány na toxické pyrrolové deriváty. Přástevník starčkový, což je druh můry, účinně oxiduje PA enzymem senecionin-*N*-oxygenázou. Tento enzym je vysoce specifický pro pyrrolizidinové alkaloidy a jeho aktivita je nejvyšší u PA senecioninového typu. [33]

Oreina cacaliae (mandelinka havezová) izoluje PA senecioninového typu z alpských rostlin *Adenostyles alliariae* a *Senecio nemorensis*. Tyto rostliny syntetizují a ukládají alkaloidy jako *N*-oxidy. Brouci mají dva úložné prostory alkaloidů – tělo (přednostně hemolymfa) a exokrinní obranné žlázy. Tělo je rezervoárem, který poskytuje *N*-oxidy pro doplňování obranných žláz. Dospělí brouci tak mají uloženo 75–130 µg (v těle) a cca 4,5 µg (v sekretu), což vede k celkové koncentraci cca 0,1 % alkaloidu na jedince. Mandelinka havezová vyvinula mechanismus, který zabraňuje redukci alkaloidních *N*-oxidů ve střevě, ale sama není schopna terciární alkaloidy *N*-oxidovat. [27, 30]

Izolace PA v případě listového brouka *Platyphora boucardi* je odlišná. V broucích nejsou uloženy netoxické *N*-oxidy, ale protoxické terciární alkaloidy, které získávají brouci přímo z konzumované rostliny. Izolace PA u *P. boucardi* probíhá tak, že je absorbovaný terciární alkaloid odstraněn z hemolymfy přenosem do exokrinních žláz a shromažďován v obranných sekretech. Důvodem je pravděpodobně zabránění nahromadění škodlivých koncentrací terciárních alkaloidů v hemolymfě. Na rozdíl od mandelinky havezové neukládá PA v hemolymfě a těle. Druhy *Platyphora* se živí rostlinami, v nichž je koncentrace PA o dva řády nižší než koncentrace u rostlin, kterými se živí druhy *Oreina*. [27]

N-oxidace je pouze jedním ze způsobů, které hmyz vyvinul během evoluce proti otravě PA z konzumovaných rostlin. [26]

1.2 Vybraní zástupci pyrrolizidinových alkaloidů

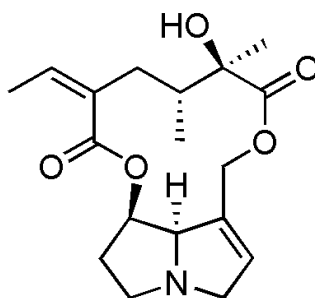
Jak již bylo řečeno, v současnosti je známo více než 600 PA. Z toho důvodu budou v rámci této kapitoly stručně popsány pouze ty nejznámější a nejčastěji se vyskytující.

1.2.1 Senecionin

Senecionin (Obrázek 8) je nejznámější toxický 12členný pyrrolizidinový alkaloid retronecinového typu. [22] Tento alkaloid je jedním z nejčastěji studovaných hepatotoxických a tumorigenních PA a vyskytuje se ve více než 50 druzích rostlin, jako jsou *Senecio vulgaris* a *Gynura segetum*. [34] Jedná se o cyklický diester a je jedním z nejčastěji se vyskytujících PA ve většině druhů čaje. [35] Společně s klivorinem (Obrázek 12), senecifylinem (Obrázek 19) a monokrotalinem (Obrázek 12) patří mezi zástupce hepatotoxických PA přítomných v mnoha čínských léčivých přípravcích extrahovaných z rostlin. [36]

U všech dosud studovaných druhů PA senecioninového typu byl senecionin *N*-oxid identifikován jako primární produkt biosyntézy a lze jej považovat za pátevní strukturu většiny PA. [37]

Senecionin vyžaduje metabolickou aktivaci, aby se projevil jeho toxický účinek. Ve studii Stefanie Hessel-Pras a kolegů způsobily dávky senecioninu akutní hepatotoxicitu, přičemž nejvyšší dávka ($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) je 2–6krát vyšší ve srovnání s dávkami hlášenými v případových studiích intoxikovaných kojenců, kteří byli v součtu vystaveni expozici PA po celé krátké období 1 nebo 2 týdnů dávkou $11\text{--}25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. [35]

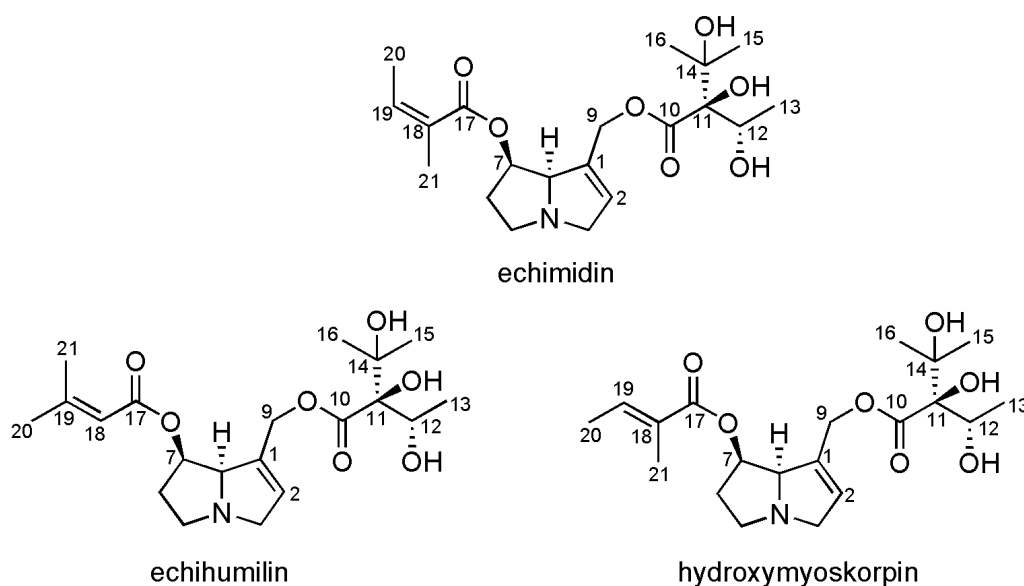


Obrázek 8 Strukturní vzorec senecioninu.

1.2.2 Echimidin

Echimidin (Obrázek 9) představuje hlavní pyrrolizidinový alkaloid vyskytující se v rostlině *Echium plantagineum* L. (hadinec jitrocelovitý), která je domestikovaná v mnoha zemích. [38] Strukturálně se jedná o diester s otevřeným řetězcem retronecinového typu, který se velmi často vyskytuje v medu. [22, 39]

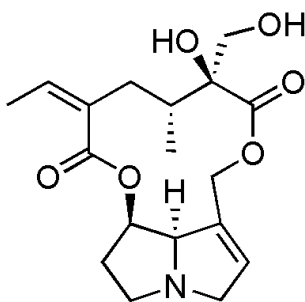
Kromě toho, že *E. plantagineum* obsahuje PA, tak je tradičně používán jako diaforetikum, diuretikum, činidlo pro hojení ran, a také proti kašli. V kosmetickém průmyslu nachází své uplatnění echiový olej. Echimidin má ještě dva méně známé deriváty – echihumilin a hydroxymyoskorpín (Obrázek 9). Echimidin se v současné době používá jako standard pro stanovení toxických limitů pro PA v mnoha produktech, proto je jeho čistota velmi důležitá. Ve švýcarské studii z roku 2022, která se zabývala právě alkaloidy z *E. plantagineum*, obsahoval extrakt methanolu téměř 90 % echimidinu, jako *N*-oxidu, jenž reprezentoval ostrý pík ve spektru získaném pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). Další analýza údajů získaných pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a HPLC však ukázala, že tento pík jsou ve skutečnosti píky dva, přičemž jeden, větší pík, je echimidin a druhý je směs echihumilinu a hydroxymyoskorpínu. Tyto alkaloidy byly pravděpodobně dříve přehlíženy z toho důvodu, že pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) je relativně komplikované rozlišit jednotlivé izomery, a co se týče ^1H NMR, tak se z důvodu strukturální podobnosti mohou signály ve spektrech se vyskytující vzájemně překrývat. [38]



Obrázek 9 Echimidin a jeho izomery (upraveno dle citace [38]).

1.2.3 Retrorsin

Retrorsin (Obrázek 10) patří do kategorie PA retronecinového typu. Je to 12členný makrocyclický diesterový pyrrolizidinový alkaloid s 1,2-nenasycenou dvojnou vazbou vázanou na esterovou skupinu v poloze C7 necinové báze. Vyskytuje se v rostlinách rodu *Senecio* (starček), a to v různých regionech světa. Je o něm známo, že způsobuje závažnou akutní hepatotoxicitu, kdy toxická dávka činí přibližně $140 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. [40, 41] Retrorsin je jedním z nejčastěji se vyskytujících pyrrolizidinových alkaloidů v bylinných čajích spolu se senecioninem a senecifylinem. Nachází se také v bylinných doplňcích stravy a lécích, v potravinách a krmivech pro hospodářská zvířata. [42]

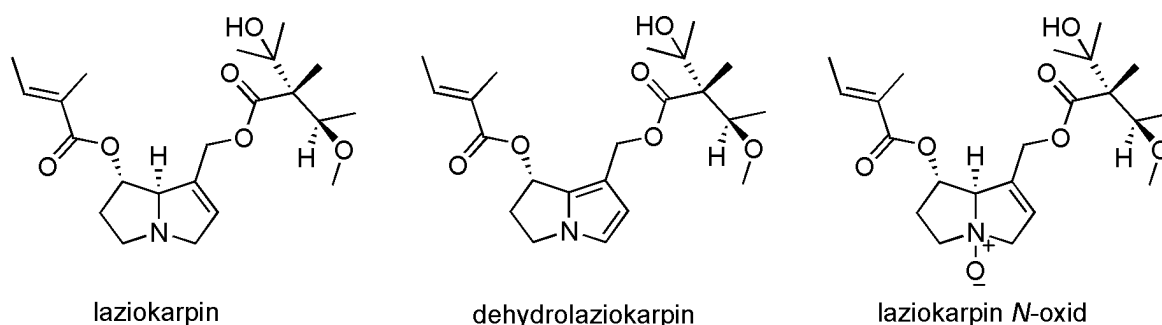


Obrázek 10 Strukturní vzorec retrorsinu.

1.2.4 Laziokarpin

Laziokarpin (Obrázek 11) je diester s otevřeným řetězcem heliotridinového typu [22] a jedná se o jeden z nejtoxičtějších PA. Laziokarpin je produkován rostlinami druhu *Heliotropium* (otočník) a *Symphytum* (kostival). Tyto rostliny se používají v medicíně díky svým léčivým účinkům, ale mohou také kontaminovat některé suroviny pro výroby potravin, jako například pšenici. Laziokarpin byl detekován v pšeničné mouce, která způsobila vypuknutí otravy lidí v Afghánistánu v letech 2007–2008, [28] kdy bylo identifikováno 38 případů masivního ascitu a čtyři úmrtí. [43] Laziokarpin je na základě své LD_{50} (smrtelná dávka pro polovinu testované populace), která je $77 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, druhým nejsilnějším toxinem po retrorsinu ($34 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) u potkanů, kterým byla v rámci výzkumu podána jednorázová intraperitoneální dávka. Stejně jako všechny ostatní hepatotoxické PA, je laziokarpin toxický pouze po jeho metabolické přeměně (oxidaci) na toxický meziprodukt, známý jako dehydrolaziokarpin (Obrázek 11). Také může být oxidován na netoxický laziokarpin *N*-oxid

(Obrázek 11). [28] U myši byly po podání laziokarpinu pozorovány jaterní hematokomy, a také alveolární a bronchiolární novotvary. [11]



Obrázek 11 Laziokarpin, dehydrolaziokarpin a laziokarpin *N*-oxid.

1.2.5 Klivorin

Jedná se o PA otonecinového typu. Klivorin (Obrázek 12) patří mezi zástupce hepatotoxických PA a je přítomen v mnoha čínských rostlinných léčebných přípravcích používaných pro zmírnění kašle, při léčbě hepatitidy a zánětlivých onemocnění. [36, 44] Nejčastěji se izoluje z čínské léčivé rostliny *Ligularia hodgsonii* Hook., ale i z jiných druhů rodu *Ligularia* (popelivka). [45, 46] Klivorin má toxické účinky bez metabolické aktivace, což bylo prokázáno na nejjaterních buňkách bez enzymů P450. [44] Kromě toho by chemická struktura tohoto alkaloidu mohla zvýšit schopnost proniknout hematoencefalickou bariérou, což naznačuje, že klivorin může způsobit poškození neuronů v centrálním nervovém systému. [46]

1.2.6 Monokrotalin

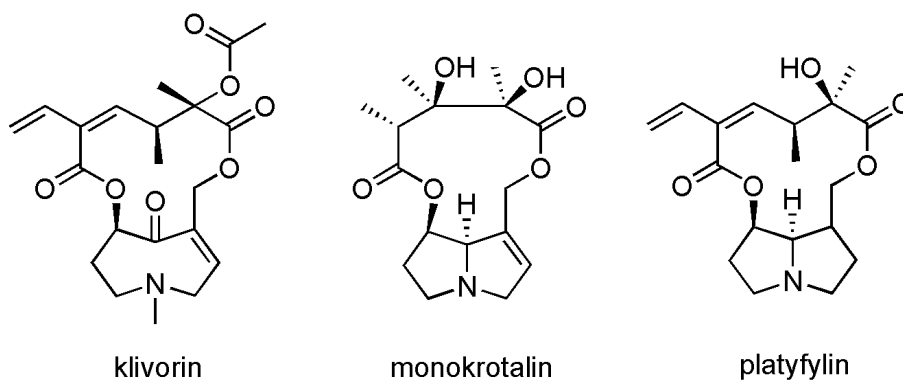
Monokrotalin (Obrázek 12) je 11členný toxický alkaloid retronecinového typu. Strukturně se jedná o makrocyclický diester složený z necinové báze a kyseliny monokrotalové. Vyskytuje se v rostlinách rodu *Crotalaria* a způsobuje hepatotoxicitu u lidí a zvířat. Intraperitoneální (uvnitř dutiny břišní) injekce monokrotalinu o koncentraci $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ způsobila u potkanů poškození jaterních parenchymálních buněk, které se začalo projevovat již po 12 hodinách po podání. V této době se v oblastech poškození jaterních buněk objevil zánětlivý infiltrát sestávající z neutrofilů. [47, 48, 49]

Toxicita monokrotalinu postihuje játra, plíce a srdce, což způsobuje syndrom jaterní sinusové obstrukce, plicní arteriální hypertenzi a hypertrofii pravé komory. [50] Monokrotalin *N*-oxid, primární metabolit monokrotalinu, je také toxický, kvůli jeho přeměně na monokrotalin vznikající prostřednictvím střevní a jaterní biotransformace. [51]

1.2.7 Platyfylin

Platyfylin (Obrázek 12) je diester s otevřeným řetězcem platynecinového typu. Tyto nejsou vůbec nebo jen velmi málo toxické, a to z důvodu nedostatku metabolické aktivace, kdy hlavní metabolická dráha nevede k tvorbě reaktivního pyrrolového esteru. [23, 52] Netoxické PA platynecinového typu jsou často přítomny v rostlinách společně s toxickými PA retronecinového typu. Několik studií realizovaných na zvířatech v letech 1939–1968 uvádělo, že PA platynecinového typu, jako je rosmarinin a právě platyfylin, nebyly hepatotoxické. Dokonce ani při akutní subletální dávce nezpůsobil platyfylin významné poškození jater nebo ledvin u pokusných myší, potkanů a morčat. [52]

Znalost podrobných metabolických drah PA platynecinového typu zůstává z velké části neobjasněna, hlavně proto, že nelze stanovit nestabilní estery pyrrolu produkované metabolickou aktivací. [52]



Obrázek 12 Klivorin, monokrotalin, platyfylin.

2 TOXICITA PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

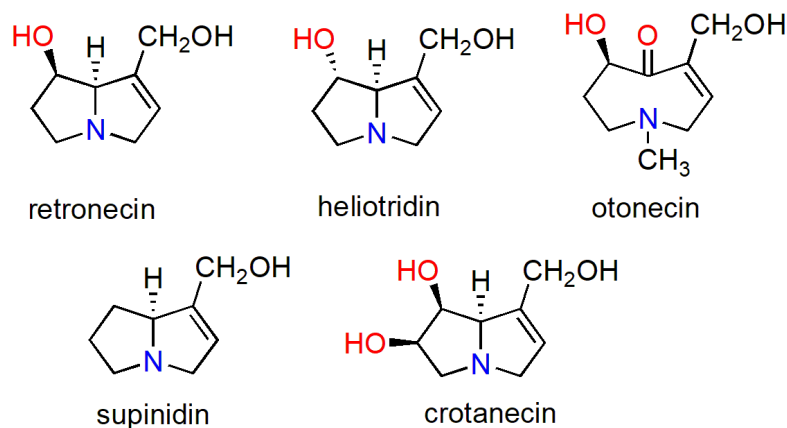
Pyrrolizidinové alkaloidy představují jedny z nejběžnějších toxinů rostlinného původu [53] a jejich požití je obvykle doprovázeno příznaky jako je nevolnost, zvracení, žloutenka a horečka vedoucí až k jaterní okluzi. [54] Z více než 660 identifikovaných PA byla u více než poloviny z nich potvrzena toxicita pro člověka a zvířata. [55]

Na celém světě bylo do roku 2018 zaznamenáno více než 10 000 případů otravy PA či PANO nejen u lidí, ale i u zvířat. [56] Příjem byl spojen s poškozením jater, plicní hypertenzí, srdeční hypertrofií, degenerativním poraněním ledvin a současně i se smrtí. [1]

Většina samotných PA jsou biologicky a toxikologicky neaktivní protoxiny, které musí být metabolicky aktivovány, aby se projevila toxicita. V důsledku toho nejsou všechny toxické. Platí, že necinové báze zvyšují toxicitu těchto sloučenin, protože jakmile jsou v těle, jsou až na výjimky aktivovány do vysoce reaktivních pyrrolových meziproductů. [54] Poté vykazují hepatotoxické, genotoxické, cytotoxické, karcinogenní a neurotoxické účinky, a tím představují vážnou hrozbu pro zdraví lidí i zvířat. [11] PA jsou také mutagenní a genotoxické pro hmyz, dokonce i pro kvasinky. [26]

Necinové báze, jejichž vybraní zástupci jsou zobrazeni na Obrázek 13, obsahují jednu dvojnou vazbu (1,2-nenasycené) a vykazují, ve srovnání s nasycenými necinovými bázemi, vyšší toxicitu. [57] Tyto alkaloidy indukují toxicitu prostřednictvím metabolické aktivace katalyzované enzymy cytochromu P450 v játrech, avšak PANO ji indukují prostřednictvím jejich biotransformace na odpovídající PA. [9]

Nasycené pyrrolizidinové alkaloidy platynecinového typu nepodléhají metabolické aktivaci na reaktivní pyrroly, které jsou zodpovědné za výše zmíněné toxické účinky. [11]



Obrázek 13 Struktura vybraných 1,2-nenasycených necinů (upraveno dle citace [2]).

Nejtoxičtějšími PA jsou ty, které patří k retronecinovému typu a obsahují monoestery nebo diestery v pozicích C7 a C9. PA retronecinového a otocninového typu, které mají dvojnou vazbu mezi atomy C1 a C2 v necinové bázi jsou hepatotoxické. Jedná se přibližně o polovinu z 660 charakterizovaných PA a PANO. Málo toxické či zcela netoxické jsou PA platynecinového typu, které mají nasycenou necinovou bázi. [23, 24] Pořadí toxicity PA retronecinového typu je následující: diester s otevřeným řetězcem (vykazuje nejvyšší účinnost tvorby pyrrol-proteinového aduktu) > makrocyclický diester > monoester. [58]

Intoxikace PA mohou být akutní, subakutní nebo chronické, kdy každá z nich se může projevat různými příznaky. [5] Chronická intoxikace nastává při dlouhodobé expozici nízkými koncentracemi a akutní při krátkodobé expozici vysokými koncentracemi PA. [59] Akutní otrava PA u lidí je spojována s poškozením jater, zatímco otrava subakutní nebo chronická může vést k cirhóze jater a plicní arteriální hypertenzi. [16]

Toxicita vyplývající z chronické expozice PA se vyskytuje hlavně v játrech, která jsou největším a nejvýznamnějším detoxifikačním orgánem v lidském těle. Dále také v plicích, cévách, a v některých případech v ledvinách, slinivce břišní, gastrointestinálním traktu, kůži, kostní dřeni a mozku. [11, 41]

2.1 Historické případy otrav

Již v historii lidé konzumovali potraviny kontaminované semeny rostlin obsahujících PA, což vedlo k epidemii onemocnění jater s odhadovanými celkovými dávkami až $170 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. [47] Případy otrav jsou dobře známy z velkých ohnisek v Africe, Pákistánu, Indii a Afghánistánu v důsledku konzumace místně pěstovaného obilí kontaminovaného PA, jež obsahovalo semena odrůd *Heliotropium* nebo *Crotalaria* (chřestnatec). Další otravy byly zaznamenány také na Jamajce, po konzumaci čajů z keřů obsahujících části rostlin *Crotalaria* a *Senecio* (starček). [11] Nejstarší doložený případ poškození jater vyvolaný PA byl zaznamenán roku 1920 v Jihoafrické republice, a to v důsledku požití pšenice kontaminované PA, kdy bylo údajně otráveno 80 osob. [43, 55] Dále je historicky známá například epidemická otrava PA, která nastala ve střední Indii v roce 1975 kvůli konzumaci prosa kontaminovaného semeny druhů *Crotalaria*. [43]

Jaterní venookluzivní onemocnění se v Afghánistánu historicky nazývá „gulranská nemoc“, jelikož se opakovaně vyskytlo právě v okrese Gulran, provincii Herát v západním Afghánistánu. [43] Klinické příznaky doprovázející venookluzivní onemocnění zahrnují ascites (zvýšené množství volné tekutiny v dutině břišní), edémy (otoky), hepatomegalii

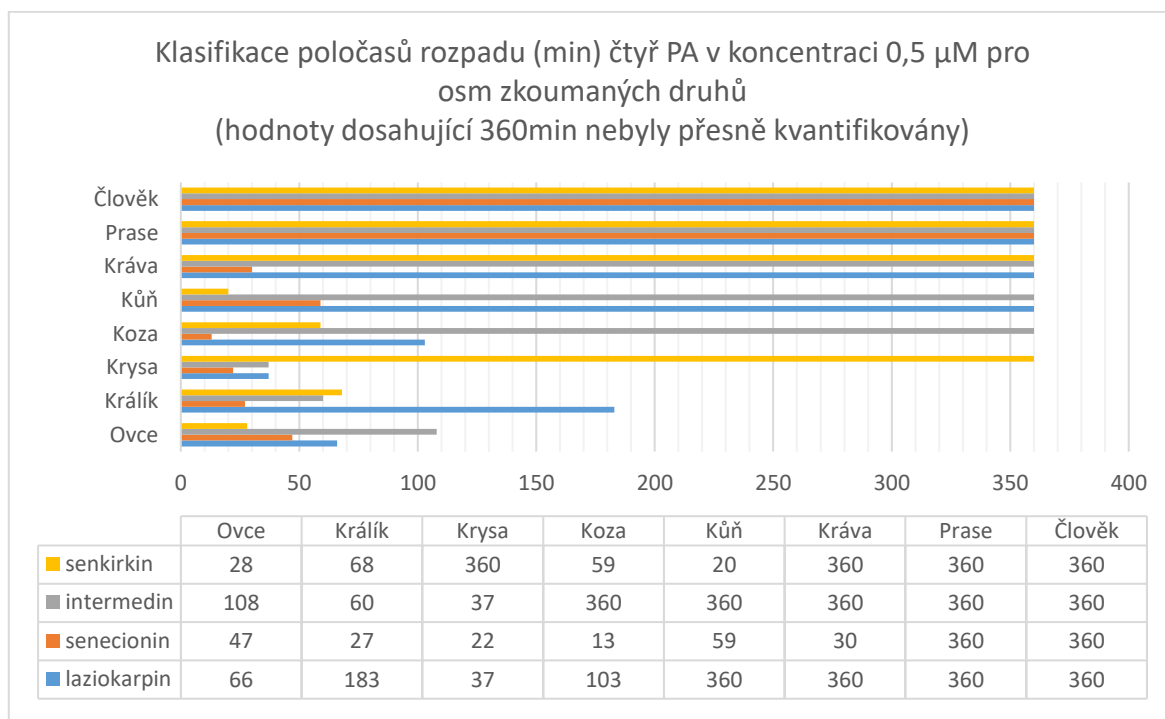
(zvětšení jater), vyhublost a zvýšení hladiny bilirubinu v krvi, což mohou vést ke žloutence. [35] Z důvodu konzumace kontaminovaného chleba rodem *Heliotropium* bylo v Afghánistánu v letech 1974–1976 postiženo téměř 8000 osob, kdy přibližně 3000 z nich trpělo těžkými intoxikacemi a přibližně 1600 jich zemřelo. Jedná se dosud o největší epidemii způsobenou PA. V letech 1999 až 2001 došlo v Gulranu k propuknutí druhého ohniska otravy, kdy šlo přibližně o 400 případů a více než 100 úmrtí. Další epidemie gulranské choroby byla zaznamenána v roce 2008. Bylo detekováno 38 případů masivního ascitu a čtyři úmrtí. Tato byla spojena s konzumací kontaminované pšeničné mouky. Je zvláštní, že přestože je plevel každoročně přítomen v celém okrese Gulran, tak se tato nemoc vyskytuje pouze v 5 z 230 vesnic. K tomu navíc ve velkých domácnostech onemocněl pouze jeden nebo dva lidé, přesto všichni jedli stejný chléb ze stejné mouky. Výsledkem hledání odpovědi na tyto otázky bylo, že u osob, které konzumovali pestřejší stravu s vyšším množstvím bílkovin spolu s nižším množstvím pšenice, byl zaznamenán nižší výskyt onemocnění [35, 43]

Nejnižší známá dávka spojená s otravou a úmrtím po krátkodobé expozici (4–14 dní) je popsána ve dvou kazuistikách. U 6měsíční dívky a 2měsíčního chlapce (oba mexicko-amerického původu), kterým se podával *Senecio longilobus* jako bylinná čajová infuze, byla zaznamenána porucha funkce jater. U dívky bylo diagnostikováno jaterní venookluzivní onemocnění. Zpočátku vykazovala ascites a pleurální výpotek (nahromadění vyššího množství tekutiny v pohrudnici), následovala sinusová jaterní fibróza po dvou měsících a cirhóza jater o šest měsíců později. Chlapec trpěl hematemézou (zvracené krve) a vyvinula se u něj žloutenka. Chlapcův stav se zhoršil s nástupem záchvatů, bradykardie (zpomalení srdeční frekvence pod fyziologickou mez) a apnoe (stav, při kterém dochází k opakovanému nekontrolovanému zadržení dechu), přičemž šestý den hospitalizace zemřel. Pitva odhalila rozsáhlou nekrózu jater. Zkonzumovaná dávka je odhadována na 0,8–1,7 mg·kg⁻¹ tělesné hmotnosti denně pro dívku a 3 mg·kg⁻¹ tělesné hmotnosti denně pro chlapce pro směs PA s riddelliinem a retrorsin *N*-oxidem (Obrázek 28, str. 54), jelikož právě tyto byly hlavními složkami. [11, 60]

Konzumace PA prostřednictvím bylinných čajů a koření během těhotenství způsobila u novorozenců ascites plodu a jaterní venookluzivní onemocnění se smrtelnými následky. [11]

2.2 Mezidruhové rozdíly v náchylnosti na toxické účinky pyrrolizidinových alkaloidů

V náchylnosti k toxicitě PA jsou značné rozdíly závislé na druzích, kmenech nebo pohlavích. Z dřívějších výzkumů vyplívá, že malí býložravci, jako jsou například ovce, kozy, králíci, křečci či morčata, jsou odolnější a tolerují vyšší dávky PA, zatímco kuřata, krůty, koně, skot a prasata jsou považovány za citlivější druhy. [10] Dále jsou k intoxikaci PA náchylní například potkani, a to kvůli vysoké míře tvorby pyrrolických metabolitů a jejich nedostatečné hydrolýze zprostředkované karboxylesterázou. [28] Z tohoto důvodu byla v roce 2017 vědkyní Franziskou Kolrep a dalšími studována *in vitro* rychlost degradace čtyř často se vyskytujících PA jaterními enzymy z lidských, prasečích, kravských, koňských, potkaních králičích, kozích a ovčích jater. Jejich výsledky jsou shrnuty na Obrázek 14. Ve výzkumu nebyla pozorována téměř žádná metabolická degradace jakékoli PA u vnímavějších druhů, jako je člověk, prase, kůň nebo kráva, což se shoduje s předešle realizovanými studii. Fyziologie prasat je, včetně jaterních cytochromů P450, dosti podobná fyziologii lidí, z čehož lze usoudit, že citlivost prasat na PA bude téměř totožná, jako je tomu u lidí. [10]



Obrázek 14 Klasifikace poločasů rozpadu (min) lasiokarpinu, senecioninu, intermedinu a senkirkinu v koncentraci 0,5 μM pro osm zkoumaných druhů (upraveno dle citace [10]).

3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

Pyrrrolizinový kruh představuje základní stavební jednotku pro mnoho přírodních a syntetických sloučenin vykazujících různé biologické účinky. [61] Vzhledem k tomu, že vyšší rostliny přispívají k vývoji chemoterapeutik právě tvorbou sekundárních metabolitů, jsou PA považovány za farmakologicky významné. [62]

Navzdory své toxicitě a negativním dopadům na lidské zdraví mohou být některé PA použity k léčbě onemocnění a infekcí. Jednou z nejdůležitějších vlastností těchto PA je jejich inhibiční aktivita glykosidázy, potenciálně vedoucí k antimikrobiálním, antivirovým, protinádorovým, fungicidním, a také k antidiabetickým účinkům. [63] Z toho důvodu mají široké využití v lidové medicíně. Většina poznatků o biologické aktivitě PA byla získána z laboratorních studií a testů *in vitro*. V současné době není k dispozici dostatek klinických důkazů rozšiřujících doposud získané informace. [59, 64] Glykosidázy jsou enzymy podílející se na řadě důležitých biologických procesů, jako je střevní trávení, posttranslační zpracování glykoproteinů, a lysozomální katabolismus glykokonjugátů. [63]

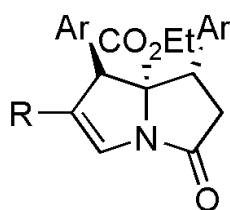
3.1 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivitu lze definovat jako usmrcování nebo inhibici růstu zejména patogenních mikroorganismů. Mezi PA byly nalezeny sloučeniny mající antibakteriální či protiplísňovou aktivitu. [64] Bakteriální onemocnění mohou mít za následek mnoho závažných nebo život ohrožujících komplikací, jako je otrava krve, selhání ledvin a syndrom toxického šoku. [65]

Vědci Xianxiu Xu a spolupracovníky byla v roce 2011 provedena přímá syntéza 6-azabicyklo[3.2.1]okt-6-en-2-onů (Obrázek 15) a pyrrolizidinů z divinylketonů. Za zásaditých podmínek se 6-azabicyklo[3.2.1]okt-6-en-2-ony a pyrrolizidiny účinně syntetizují v jediném kroku z ethylisokynoacetátu a divinylketonů nesoucích arylovou nebo alkylovou skupinu v poloze C2. [66]

Výše zmíněným alkaloidem, pod názvem PA-1, se v roce 2013 zabývali Na Li a kolegové. PA-1 vykazoval velmi dobrou antibakteriální aktivitu vůči šesti testovaným bakteriím s minimálními hodnotami inhibiční koncentrace (MIC) v rozmezí od 3,9 do 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a dvěma plísním s MIC = 62,5–125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tuto aktivitu vyvíjel tím, že působil na membránové fosfolipidy a fosfátové skupiny a poté poškozoval struktury buněčné membrány, což nakonec vedlo k zabití těchto druhů mikroorganismu. PA-1 vykazoval

silnější antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*) bakteriím než proti gramnegativním (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) bakteriím a mikromycetám (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*). Ve srovnání s penicilinem vykazoval PA-1 velmi podobnou antimikrobiální aktivitu proti *S. epidermidis*, *S. aureus*, *A. niger* a *C. albicans*. Vzhledem k chloramfenikolu měl tento nový alkaloid podobnou antimikrobiální aktivitu proti téměř všem testovaným patogenům. Zatímco ve srovnání s erythromycinem měl opět téměř shodnou antibakteriální aktivitu proti *S. epidermidis*, *S. aureus*, a dokonce vyšší vůči *E. coli* a *B. subtilis*. [65]



Obrázek 15 Strukturní vzorec 6-azabicyklo[3.2.1]okt-6-en-2-onu (upraveno dle citace [66]).

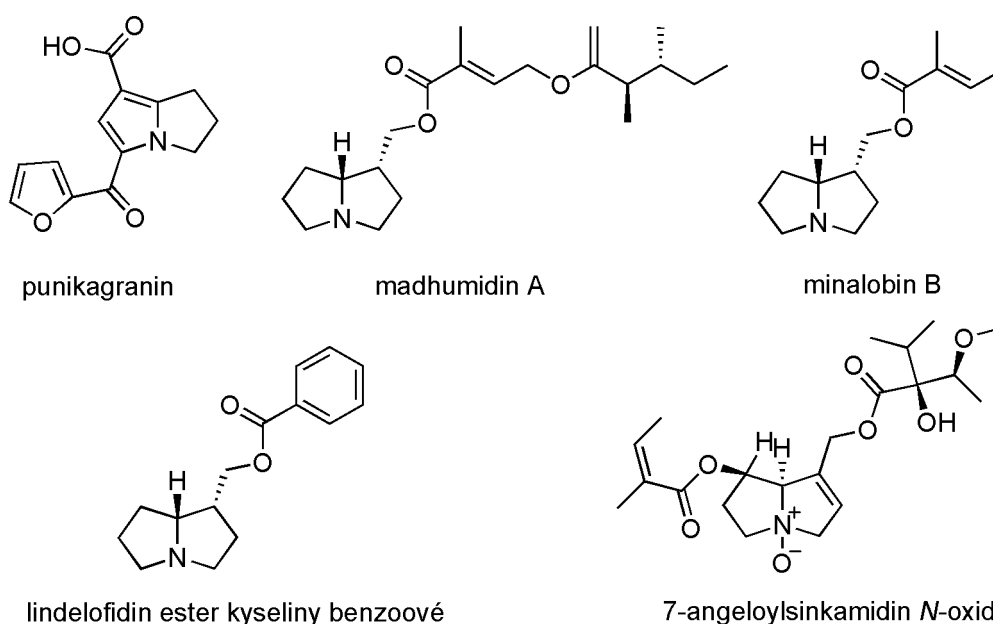
Dále u (již zmíněného) monokrotalinu (Obrázek 12) upozoroval Gessiane F. Germano a jeho spolupracovníci antiprotozoální aktivitu, při které dávka 1,0 mg·ml⁻¹ způsobila smrt 80 % trofozoitů *Trichomonas vaginalis* (bičenka poševní), etiologického původce trichomoniázy. [49]

3.2 Protizánětlivá aktivita

Zánětlivý proces je nezbytná fyziologická reakce tkáně na škodlivý podnět jako je trauma nebo patogenní agens. Jedná se o obranný způsob reakce organismu či tkáně na odstranění škodlivých podnětů, jako jsou patogeny, poškozené buňky nebo dráždivé látky. Zánětlivá reakce může být lokální nebo může působit na rozsáhlejší část organismu. [61, 67] Buňky zánětlivého systému také přispívají k hojení ran tím, že se hromadí v poškozených oblastech tkáně, kde odstraňují buněčné úlomky a uvolňují mediátory, které podporují opravu tkání. [47] Nemoci obvykle zahrnují pokračující zánětlivou reakci, jako je ta, která je pozorována u aterosklerózy a rakoviny. Zánět je kritickou složkou progresu nádoru a mnoho typů nádorových onemocnění vzniká z míst infekce, chronického podráždění a zánětu. [64]

Některé rostlinné alkaloidy, včetně pyrrolizidinových alkaloidů izolovaných z nadzemních částí polokeře *Heliotropium digynum* (otočník), slupek plodu *Punica granatum* (granátovník obecný) a listů stromu *Madhuca pasquieri* (madhuka), vykazují řadu protizánětlivých účinků. [68] Jedná se o 7-angeloylsinkamidin *N*-oxid, který byl izolován z otočníku [69], punikagranin, izolovaný z granátovníku obecného, a dále madhumidin A, lindelofidin ester kyseliny benzoové a minalobin B, které byly izolovány z *Madhuca pasquieri*. [70] Všechny PA izolované z těchto rostlin jsou znázorněny na Obrázek 16. V buňkách indukovaných lipopolysacharidy vykazovaly tyto alkaloidy mírné inhibiční účinky proti produkci oxidu dusnatého indukovaného lipopolysacharidy. [68]

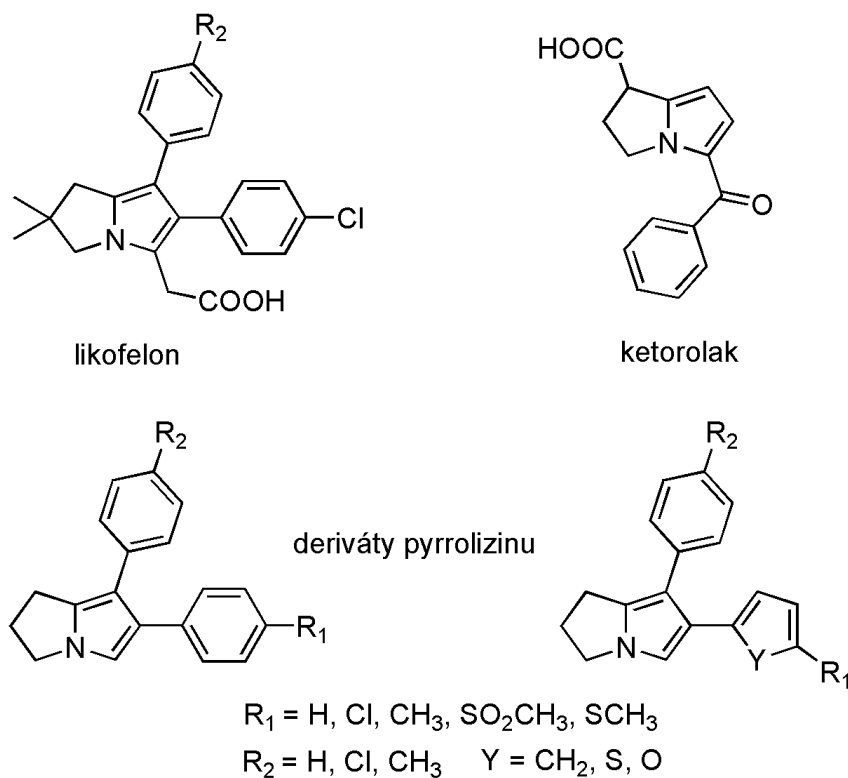
Punikagranin je pyrrolizidinový alkaloid, který obsahuje karboxylovou a furan-2-karboxylovou skupinu. Tento PA s unikátní strukturou byl izolován z kůry stromu nižšího vzrůstu zvaného *Punica granatum* (granátovník obecný) a prokázal inhibici produkce oxidu dusnatého s hodnotou $IC_{50} = 22,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$ v buňkách RAW 264.7 stimulovaných lipopolysacharidy. *Punica granatum* L. patří do čeledi *Punicaceae*, což je nejmenší čeleď rostlin, která zahrnuje jeden rod a dva druhy, a roste hlavně na Středním východě, v Indii, Číně, Španělsku, Izraeli a Latinské Americe. Kůry *Punica granatum*, známé jako tradiční čínská medicína, se používají při léčbě traumatického krvácení, vředů, infekcí a poruch trávicího traktu, jako je průjem a úplavice. Bylo prokázáno, že extrakty ze slupek mají protirakovinné účinky, které mohou být spojeny i s těmi protizánětlivými. [71]



Obrázek 16 PA izolované z *Punica granatum* a *Madhuca pasquieri*.

Nesteroidní protizánětlivé léky, které jsou rozsáhle používány pro snížení bolesti a otoku spojeného se zánětem, představují výzkumnou oblast nepřetržitého a stále rostoucího vývoje. Tyto způsobují několik závažných nežádoucích účinků, přičemž nejdůležitější z nich je poranění žaludku, které může později způsobit vznik žaludečního vředu a poškození ledvin. Z toho důvodu je snahou na klinický trh přinést netoxická protizánětlivá léčiva. [61]

Likofelon (Obrázek 17) je léčivo vykazující významnou protizánětlivou aktivitu, což bylo prokázáno v řadě studií realizovaných na zvířatech s cílem ověřit jeho aktivitu při léčbě akutních a chronických zánětů. V klinických studiích také prokázal protizánětlivou a analgetickou aktivitu u osteoartrózy. Dalším významným derivátem používaným v klinické praxi je ketorolak (Obrázek 17) působící jako neselektivní inhibitor enzymů cyklooxygenázy, které mohou hrát důležitou roli při léčbě závažné neuropatické bolesti. Další účinné deriváty pyrrolizinu, jejichž struktura odpovídá vzorcům uvedeným na Obrázek 17, představují 6,7-diaryl-2,3-dihydropyrroliziny, respektive 6-heteroaryl-7-aryl-2,3-dihydropyrroliziny. Tyto postrádají volnou karboxylovou skupinu charakteristickou pro většinu nesteroidních protizánětlivých léčiv. [61, 72]



Obrázek 17 Pyrrolizinové sloučeniny s protizánětlivou aktivitou (upraveno dle citace [61]).

3.3 Protinádorová aktivita

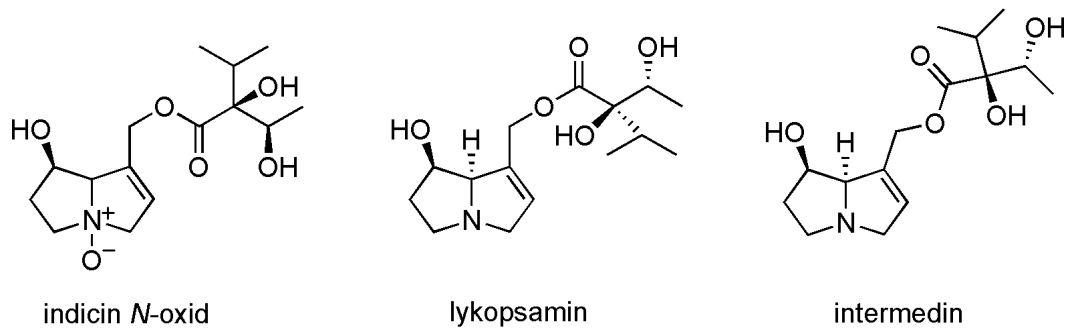
Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí na celém světě. Celosvětově se v posledních třech desetiletích podstatně zvýšil její výskyt, což vedlo k nárůstu předepisování chemoterapeutických léků. Vývoj nových sloučenin vykazujících antineoplastickou aktivitu je proto naléhavý. [64]

Heliotropium indicum L. obsahuje pyrrolizidinový alkaloid indicin *N*-oxid (Obrázek 18) vykazující protirakovinné účinky [73]. Byl také klinicky testován na léčbu leukémie, ale ve výsledku byl stažen z klinického hodnocení kvůli jeho značné toxicitě. [74]

Z praktického hlediska nemusí být použití PA pro léčbu rakoviny praktické, jelikož postrádají specifickou pro rakovinné buňky, což může způsobit poškození i „normálních“ buněk. K tomu navíc, i když PA mohou být dodány specificky rakovinným buňkám, neexistuje žádný cytochrom P450 schopný přeměnit PA na toxické meziproducty, dehydro PA. Ideální strategií pro aplikaci PA při léčbě rakoviny by tak mohla být přímá syntéza dehydro PA na cílených rakovinných buňkách. K dosažení tohoto cíle jsou zapotřebí dvě základní složky:

- prekurzor schopný chemické přeměny na dehydro PA,
- biokatalyzátor nahrazující cytochrom P450 k aktivaci prekurzoru v místě cílových rakovinných buněk. [14]

Lykopsamin (Obrázek 18) je pyrrolizidinový alkaloid s monoesterem retronecinového typu, který vykazuje významnou biologickou aktivitu proti rakovině plic. [64] Je jednou z hlavních složek PA u kostivalu lékařského. Kostival je léčivá rostlina, která se tradičně používá v lidové medicíně i v moderní terapii zevně pro tupá zranění, modřiny a podvrtnutí. Použití jeho kořene je v některých zemích omezeno kvůli obsahu PA. V léčivých přípravcích může být denní množství a trvání léčby omezeno i v případě kožní aplikace. Vzhledem k dobré absorpci PA z gastrointestinálního traktu je zákaz perorálního podávání oprávněný. [75] Na druhou stranu je považován za méně toxický a špatně se vstřebává lidskou kůží. Z toho důvodu by použití kostivalové masti nemělo představovat zásadní riziko. V kostivalu je také mimo jiné přítomen intermedin (Obrázek 18), který je diastereisomerem lykopsaminu. [76]



Obrázek 18 Indicin *N*-oxid, lykopsamin a intermedin.

4 VÝSKYT PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

4.1 Výskyt v rostlinách

Pyrrrolizidinové alkaloidy jsou produkovány více než 6000 druhy rostlin, což tvoří přibližně 3 % všech známých rostlin vyskytujících se po celém světě. [2] Nejhojněji jsou pyrrrolizidinové alkaloidy zastoupeny v níže uvedených rostlinných čeledích a rodech:

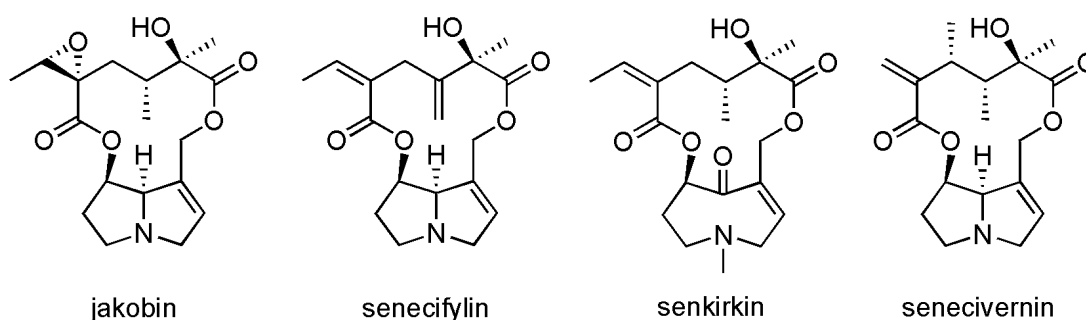
- *Boraginaceae* (brutnákovité)
 - rod *Echium* (hadinec)
 - rod *Heliotropium* (otočník) a jiné
- *Asteraceae* (hvězdnicovité)
 - rod *Senecio* (starček)
 - rod *Eupatorium* (sadec)
- *Fabaceae* (bobovité)
 - rod *Crotalarieae* (chřestnatec)
- *Orchidaceae* (vstavačovité neboli orchideje)
 - rod *Liparis* (hlízovec)
 - rod *Phanaleopsis* (můrovec). [77]

Nejčastější výskyt byl zaznamenán v rostlinách rodu *Senecio* [4], *Echium* [5], *Crotalaria* [6] a *Eupatorium* [7, 8]. PA jsou produkovány pravděpodobně jako obrana proti predátorům. [19] Mimo výše jmenované se PA vyskytují méně často či jen ojediněle i v jiných rostlinných čeledích a druzích.

4.1.1 *Senecio*

Po celém světě je distribuováno více než 1000 poddruhů rodu *Senecio* (starček). [78] Skot se může otrávit pyrrrolizidinovými alkaloidy především konzumací sena otráveného *Senecia* [33] a právě rostliny tohoto rodu jsou zodpovědné za onemocnění jater u koní a krav a mohou vést k úmrtí postižených zvířat. [79] Savci se konzumací rostlin rodu *Senecio*, které PA obsahují, zpravidla vyhýbají. Jinak je tomu ale u některých druhů hmyzu, které se jím živí. Hmyzím zástupcem, který se živí výhradně *Seneciem* je například bleší brouk *longitarsus jacobaeae* (dřepčík). [33] Dalším příkladem může být již výše

zmíněný *Tyria jacobaeae* (přástevník starčkový). [26] Pátevní strukturou většiny PA u druhů *Senecio* je senecionin *N*-oxid (Obrázek 7). Další PA, které se vyskytují v tomto rodu, jsou senecifylin, jakobin, senkirkin a senecivernin (Obrázek 19), přičemž jsou všechny strukturně odvozeny od senecioninu. Druh *Senecio* je velmi rozmanitý na výskyt PA. Každý druh obvykle obsahuje více PA a má druhově specifický vzor těchto sloučenin. V kořenech byly PA téměř výhradně přítomny jako *N*-oxidy, zatímco ve výhoncích bylo asi 35 % PA přítomno jako terciární volné báze. [33]



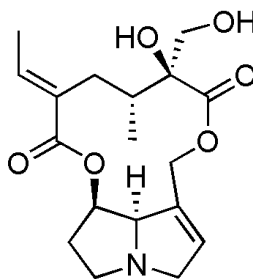
Obrázek 19 PA odvozeny od senecioninu vyskytující se v rostlinách rodu *Senecio*.

4.1.2 *Echium*

Rostliny rodu *Echium* (hadinec) jsou důležitým zdrojem potravy včely medonosné. *Echium plantagineum* L. (hadinec jitrocelovitý), které se běžně říká „Patersonovo prokletí“, je rostlina domestikovaná v mnoha zemích (původem ze Středomoří) a jejím hlavním PA je echimidin. Další izomerní sloučeniny identifikované v této rostlině jsou echiumilin a hydroxymyoskorpin. [38] Všechny tři sloučeniny lze vidět na Obrázek 9.

4.1.3 *Crotalaria*

Rod *Crotalaria* (chřestnatec) se používá v tradiční medicíně k odčervení, při léčbě malárie a při léčbě horečky. Název rostliny byl odvozen od chrastivého zvuku semen, k němuž dochází v momentě, kdy je se suchými lusky zatřesen. Semena *Crotalaria cleomifolia* se konzumují na Madagaskaru při přípravě populárních nápojů. *C. cleomifolia* je keř s jednoduchými nebo složenými listy, se žlutými nebo bílými květy a plody v luscích. Ve výzkumu, provedeném A. D. H. Solofomalalem a spolupracovníky, bylo odhaleno vysoké množství alkaloidů, z nichž byly izolovány dvě sloučeniny strukturně odvozené od pyrrolizidinu, přičemž jedna byla identifikována jako usaramin (Obrázek 20), který je znám svou vysokou toxicitou. Z toho důvodu by semena této rostliny neměla být konzumována. Druhá sloučenina byla strukturně podobná usaraminu, nicméně se nepodařilo provést její kompletní strukturní identifikaci. [80]



Obrázek 20 Usaramin.

C. medicaginea (dříve nazývaná *C. trifolium*) je oblíbenou pastvinou pro koně, jenomže je u nich také spojena s řadou chronických onemocnění. Jaterní megalocytóza byla pozorována u dvou koní, kteří zkonzumovali téměř 720 kg této rostliny během dvou po sobě jdoucích sezón. [81] V roce 1963 tato rostlina způsobila úmrtí téměř 200 koní v západní Austrálii. [82] Dále byly zaznamenány otravy způsobené PA z druhů *Crotalaria* u pasoucích se hospodářských zvířat [83, 84].

4.1.4 *Eupatorium*

Celkem existuje více než 45 různých druhů rodu *Eupatorium* (sadec). Některé z nich byly studovány ve vztahu k jejich možnému využití ve farmaceutickém průmyslu [78], a to díky jejich antimikrobiálním [85, 86, 87], hojivým [87, 88], analgetickým [88], protizánětlivým [87, 88], antidiabetickým, hepatoprotektivním a antioxidačním účinkům. [87]

Eupatorium lindleyanum je tradiční čínská bylinná medicína, kterou lze nalézt na mokřích svazích nebo pastvinách. V lidovém léčitelství se běžně používá pro zmírnění nebo léčbu nežádoucích příznaků, jako je zahlenění, kašel nebo astma. Celkový obsah osmi PA v *E. lindleyanum* byl nejvyšší v kořenech, dále v květech, méně ve stonku a v nejnižším množství se vyskytovaly v listech. [89]

V rostlině *Eupatorium fortunei* bylo pomocí metody LC-MS/MS (kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií) identifikováno celkem osm PA. Jednalo se o alkaloidy intermedin, intermedin *N*-oxid, lykopsamin, lykopsamin *N*-oxid, retronecin, senecifylin a senkirkin a 7-acetylintermedin *N*-oxid, přičemž nejvíce zastoupenými byly intermedin a jeho *N*-oxid, a lykopsamin a jeho *N*-oxid, které tvořily více než 93 % celkového obsahu PA. [90]

4.1.5 *Heliotropium*

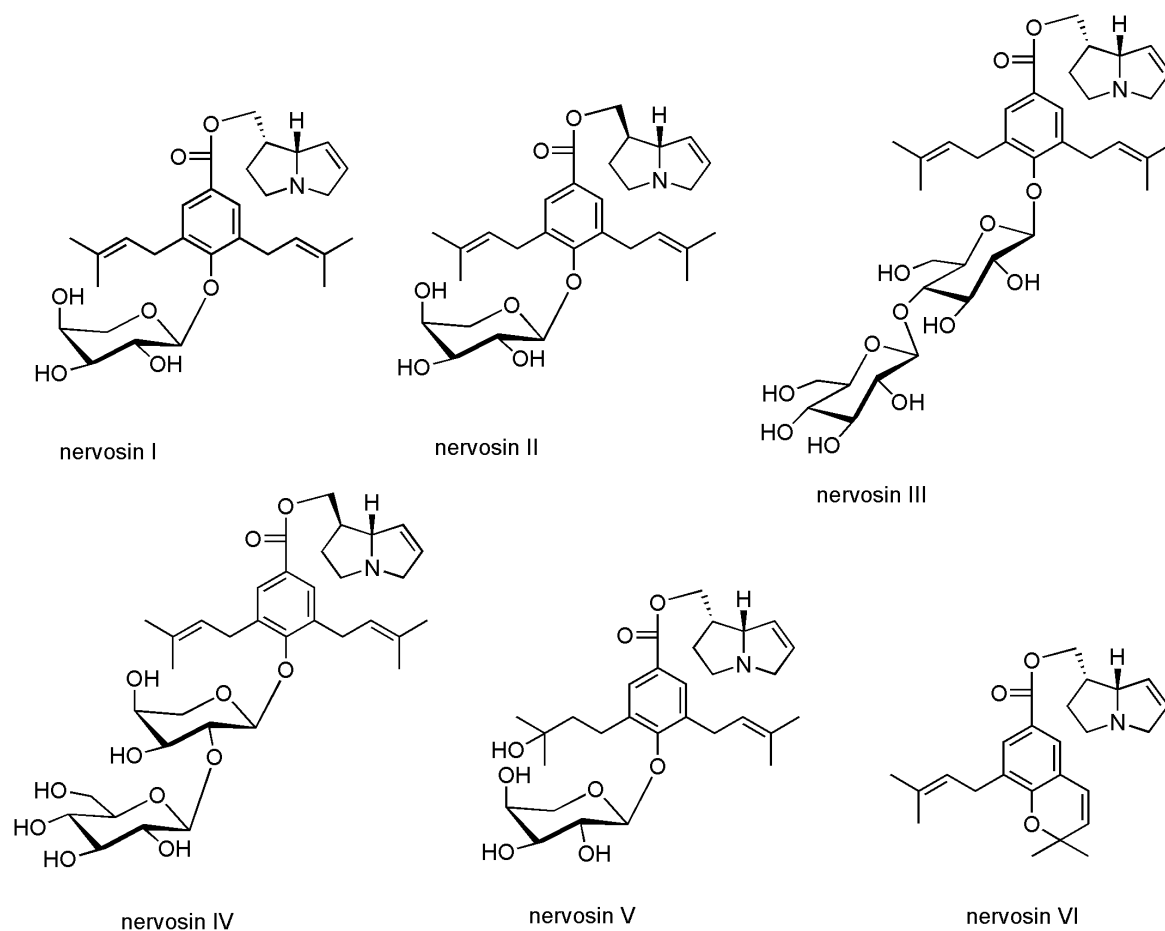
Rostliny patřící do rodu *Heliotropium* (otočník) jsou používány při léčbě mnoha zánětlivých stavů, jako je dna, revmatismus, bodnutí hmyzem nebo štírem, ale také při léčbě kožních vyrážek a nitroočních zánětlivých stavů. Bylo u nich pozorováno také mnoho jiných biologických účinků, jako jsou antivirové, cytotoxické či protihyperglykemické. [69] Nicméně PA v něm obsažené zapříčinily velké množství otrav lidí a hospodářských zvířat, včetně skotu, ovcí, kuřat, kachen a prasat. [91]

Příkladem může být otrava z února roku 2014 z oblasti Galileje v Izraeli, kdy bylo 73členné stádo hovězího dobytka (15–18 měsíců) krmeno po dobu 6 týdnů krmivem obsahujícím seno s kontaminovaným *Heliotropium europaeum*, což vedlo k úmrtnosti 33 % stáda během 63 dnů. Celkový obsah PA v kontaminovaném seně byl $3,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sušeného sena, zatímco části nadzemních rostlin *H. europaeum* obsahovaly $27,7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sušené rostliny. Nejhojnějšími terciárními PA nalezenými v *H. europaeum* a kontaminovaném seně byly heliotin dále europinem a lasiokarpin. PA *N*-oxidy tvořily hlavní část celkového složení PA v seně a v *H. europaeum* (~90 %), přičemž nejrozšířenějšími *N*-oxidy byly heliotrin *N*-oxid a europin *N*-oxid (~29 % a ~34 %), následované lasiokarpin *N*-oxidem (21 % a 14 %). [92]

4.1.6 *Liparis*

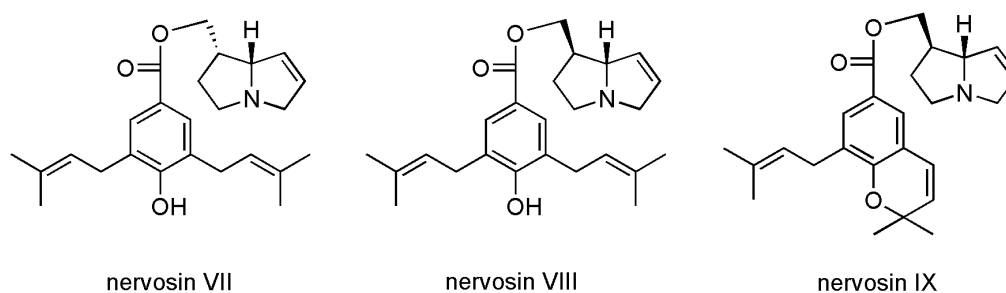
Rod *Liparis* (hlízovec) je rozšířen především v tropické a subtropické oblasti. Roste zpravidla v listnatých lesích na svazích za vlhkých podmínek v nadmořských výškách 850–1000 m n. m.

V roce 2013 bylo vědci Šuaj Chuangem a spol. izolováno z rostliny *Liparis nervosa* šest nových derivátů nervosinu, pojmenovaných jako nervosin I–VI (Obrázek 21). Struktura všech látek byla navržena pomocí běžně používaných metod strukturní analýzy, a to infračervené spektrometrie (IR) a ^1H a ^{13}C NMR. Všechny uvedené deriváty vykazovaly silné inhibiční účinky proti produkci oxidu dusnatého, která je indukovaná lipopolysacharidy v RAW 264.7 makrofázích s hodnotami $\text{IC}_{50} = 32,88 \pm 1,6 \mu\text{M}$, což značí potenciální protizánětlivou aktivitu. [93, 94]



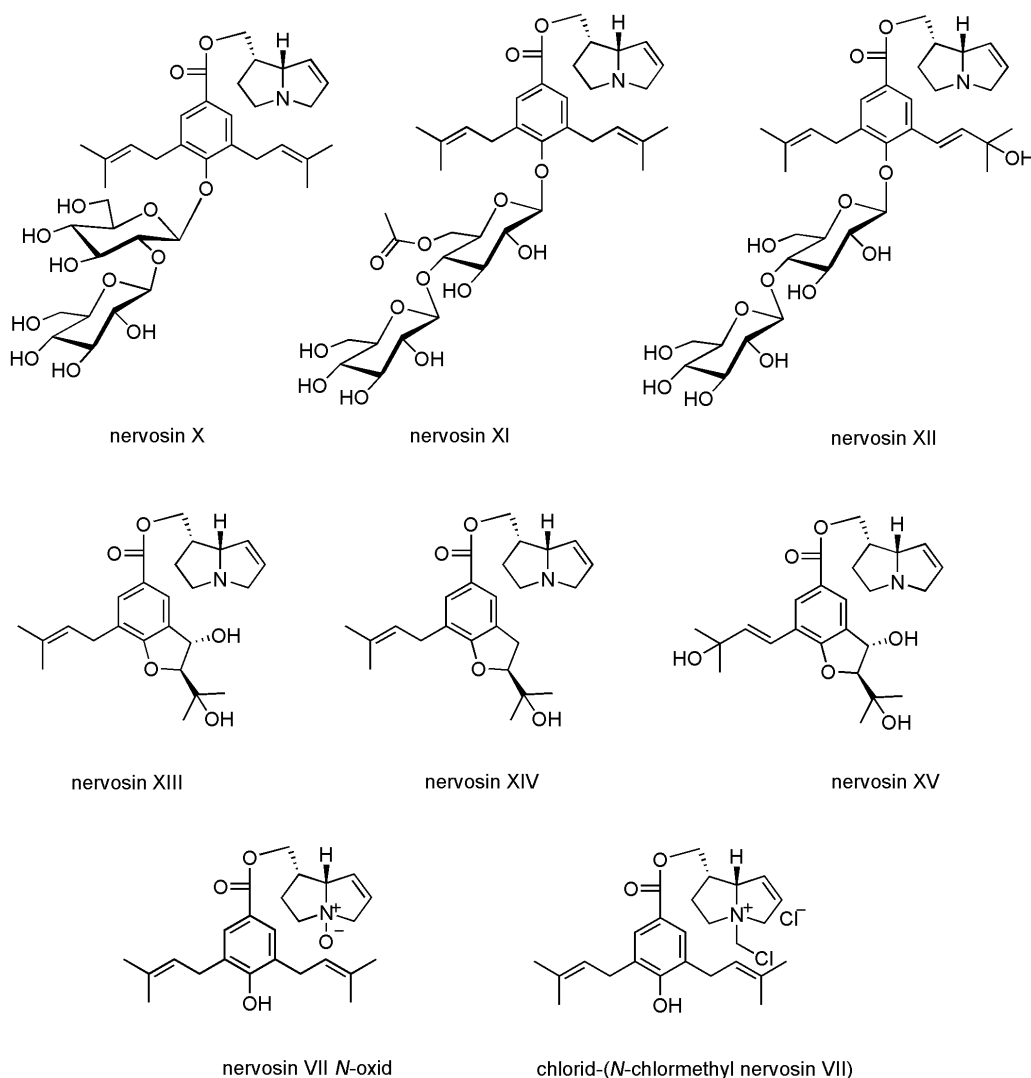
Obrázek 21 Strukturální vzorce derivátů nervosinu I–VI.

Rostlina *L. nervosa* je často používána v lidovém léčitelství pro její detoxikační a hemostatické funkce. V roce 2016 byly čínskými vědci v čele s Šuaj Chuangem získány další tři deriváty nervosinu, a to nervosin VII–IX (Obrázek 22). U všech tří sloučenin byla zkoumána jejich cytotoxická aktivita proti lidským rakovinným buněčným liniím A549, MCF-7 a H460. Výsledkem bylo, že žádný z derivátů neprokázal významnou biologickou aktivitu vůči testovaným nádorovým buněčným liniím. [95]



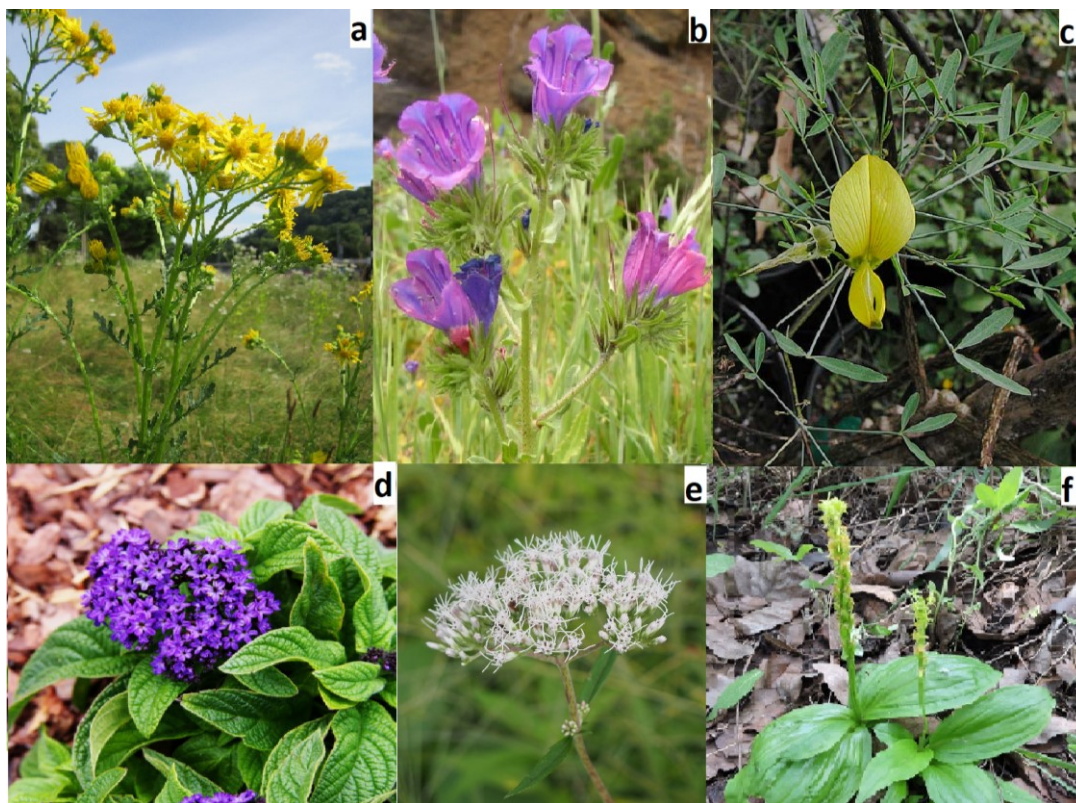
Obrázek 22 Strukturální vzorce derivátů nervosinu VII–IX.

V roce 2018 bylo, opět skupinou Šuaj Chuanga, izolováno sedm sloučenin na bázi nervosinu, a to nervosin X–XV, nervosin VII *N*-oxid a chlorid-(*N*-chlormethyl nervosin VII). Strukturální vzorce předmětných derivátů jsou znázorněny na Obrázek 23. Jejich struktura byla navržena na základě detailního studia výsledků získaných řadou experimentů realizovaných pomocí metod strukturální analýzy. Předmětné sloučeniny byly rovněž zkoumány pro jejich cytotoxicitu proti lidským rakovinným buňkám HCT116, kdy bylo zjištěno, že chlorid-(*N*-chlormethyl nervosin VII) vykazoval cytotoxickou aktivitu v mikromolární koncentraci ($IC_{50} = 32,88 \pm 1,6 \mu M$). Chlormethylová skupina spojená s atomem dusíku a hydroxyskupina na aromatickém kruhu se zdají být důležitými ve smyslu protinádorové aktivity předmětné sloučeniny. [94]



Obrázek 23 Strukturální vzorce nervosinu X–XV, nervosin VII *N*-oxidu a chloridu-(*N*-chlormethyl nervosinu VII).

Na Obrázek 24 jsou uvedeny příklady zástupců rostlinné říše, v nichž se PA vyskytují nejčastěji. Jedná se o starček (a), hadinec (b), chřestnatec (c), otočník (d), sadec neboli konopáč (e), hlízovec (f).



Obrázek 24 Příklady rostlin s obsahem PA; a) *Senecio jacobaea*, b) *Echium plantagenium*, c) *Crotalaria pallida*, d) *Heliotropium arborescens*, e) *Eupatorium lindleyanum*, f) *Liparis nervosa*.

4.2 Výskyt v potravinách

Různé typy PA a PANO v potravinách mohou pro člověka představovat různá (více či méně závažná) zdravotní rizika [9], přičemž celosvětově je zdokumentováno velké množství případů otravy těmito alkaloidy. [96] Do roku 2018 jich bylo zaznamenáno více než 10 000. [97] Příčinou intoxikace bývá požití kontaminovaných krmiv a plodin nebo přímá konzumace rostlin obsahujících PA. Zároveň byly nesčetněkrát detekovány v medu a pylu, v černém, zeleném i bylinném čaji, léčivých přípravcích extrahovaných z rostlin, doplňcích stravy, zelenině, obilovinách, koření, stejně jako v potravinách živočišného původu, jako je maso, mléko a vejce. [98] Známý jsou rovněž případy kontaminace vody či alkoholu. [53]

Hospodářská zvířata a krmiva mohou být kontaminována PA obsažených v rostlinách vyskytujících se na pastvinách a polích. [19] V případě zemědělských produktů se tak děje prostřednictvím společné sklizně. Samotné rostliny pak absorbují PA kořenovým systémem

z pudy stejně jako mnoho dalších látek. [99] V potravinářských výrobcích bylo k roku 2011 dle údajů Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) nahlášeno celkem 64 různých PA. [54] Dlouhodobý příjem PA může být ze zdravotního hlediska problematický, zejména pokud jde o pravidelnou spotřebu potravin, v nichž bývá přítomnost těchto látek detekována v relativně vysokých koncentracích (např. čaje a med). [11]

V Evropě byla od ledna 2014 do dubna 2015 v šesti různých zemích provedena analýza celkem 1105 odebraných vzorků. Jednalo se o mléko a mléčné výrobky, vejce, maso a masné výrobky, čaje a doplňky stravy běžně dostupné v supermarketech, maloobchodních prodejnách a prostřednictvím internetu. PA byly zjištěny ve velkém podílu potravin rostlinného původu, a to v 60 % doplňků stravy a v 92 % čajů. V produktech živočišného původu pak byly obsaženy PA jen zřídka, a to u 6 % vzorků mléka a u 1 % vzorků vajec. [16]

4.2.1 Med

Med je oblíbenou potravinou konzumovanou po celém světě. Navíc je nutričně významný a má i blahodárné účinky na lidské zdraví. Jeho úměrná konzumace je spojena se zdravou výživou, a to z důvodu obsahu mnoha prospěšných biologicky aktivních látek, vitaminů či esenciálních vitaminů. [100] Zároveň je ale med jedním z potravinářských výrobků, které mohou obsahovat PA. Včely sbírají pyl nebo květinový nektar z široké škály rostlin, a proto jsou v medu pozorovány různé profily PA. [101] Předchozí studie ukázaly velmi častý výskyt těchto alkaloidů v medu. [102] Jako příklad lze uvést studii výskytu PA ve španělském surovém medu, kde byly tyto látky detekovány až v 94 % analyzovaných vzorků. [103] Med vyrobený z již zmíněné rostliny *Echium plantagineum* L. je známý pro svůj vysoký obsah PA. [5]

Dle doporučení Spolkového úřadu pro hodnocení rizik (BfR; z němčiny Das Bundesinstitut für Risikobewertung) by perorální příjem PA neměl překročit denní dávku $0,007 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Vezmeme-li tedy osobu o hmotnosti 60 kg, která denně konzumuje 20 g medu, tak by daný vzorek medu neměl obsahovat více než $21 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ PA. [104]

Kromě přítomnosti PA v samotném medu je třeba mít na paměti také to, že se med spolu s těmito kontaminanty dostává i do dalších výrobků. Takovým příkladem může být třeba medovina, kdy je spolu s hepatotoxickými PA konzumován i ethanol, jehož samotná konzumace může způsobovat závažná onemocnění jater. [53]

4.2.2 Čaj a bylinný čaj

Po pitné vodě je čaj celosvětově nejčastěji konzumovaným nápojem. [105] Tento velmi oblíbený a levný nápoj se získává zpracováním listů čajovníku, přičemž jeden z nejčastěji konzumovaných čajů jsou listy keře *Camellia sinensis* (čajovník čínský). Tento se vyznačuje svými antioxidačními a protirakovinnými vlastnostmi, přičemž také pomáhá proti diabetu a částečně i proti obezitě. [106] Roční spotřeba čaje se odhaduje na 297 miliard litrů, tj. spotřeba na jednoho obyvatele činí přibližně 37 litrů ročně. Jeho kvalita závisí mimo jiné na zemědělských podmínkách a správné sklizni. Přítomnost PA v čaji je přisuzována pleveli, jelikož právě plevel je schopen jej kontaminovat. [105] Čaj je jedním z nejdůležitějších zdrojů expozice PA a jejich *N*-oxidů, a to hlavně z důvodu vysokého počtu osob, kteří jej konzumují v enormním množství. [60] Ovocný čaj nebývá kontaminován rostlinami obsahujícími PA, a proto nemá na celkový příjem PA vliv. [11]

S problematikou výskytu PA v čaji se pojí i nedávno publikovaná práce Hanse Reinharda & Otmara Zollera. [105] V této studii byly v letech 2013–2020 sledovány tři bylinné čajové výrobky se sedmi různými šaržemi a pět ledových čajových nápojů, přičemž se v průběhu času obsah PA značně změnil. Zatímco byl zaznamenán významný pokles celkové hladiny PA ve smíšeném bylinném čaji (>80 %) a dvou mátových (>95 %), obsah PA značně vzrostl ve čtyřech z pěti nápojů z ledového čaje (>80 %). Ačkoliv je příjem ledového čaje ve srovnání s konzumací ostatních čajů u běžných konzumentů zanedbatelný, mohl by zde být problém u častých konzumentů tohoto typu výrobku, kterými mohou být i děti.

Ve studii publikované v roce 2017 Patrickem P.J. Mulderem a spolupracovníky [16] obsahovalo PA 92 % čajů (zelených, černých a bylinných). Vzhledem k tomu, že téměř všechny druhy čaje obsahovaly vysoké množství PA, představuje čaj problém z hlediska bezpečnosti potravin. V rámci různých typů čaje lze detekovat různé profily PA nicméně zde dominovaly PA senecioninového typu, a to zejména senecionin (Obrázek 8, str. 18), retrorsin (Obrázek 10, str. 20), senecifylin (Obrázek 19, str. 34), senecivernin (Obrázek 19, str. 34) a jejich *N*-oxidy, které dohromady představovaly 76 % celkového obsahu PA. Černý čaj obsahoval podstatně vyšší množství příslušných *N*-oxidů než čaj zelený.

Evropská komise zveřejnila v prosinci 2020 maximální limity PA pro čajové a bylinné čaje. Maximální limity se pohybují od $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ u některých tekutých produktů pro kojence a malé děti až do $400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ u některých sušených bylin pro bylinné čaje. Dále jsou zde

obsaženy i maximální limity například pro některá koření jako je oregano, majoránka či libeček, a to do $1000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. [107]

Nabízí se otázka, zdali je konzumace čaje kontaminovaného PA bezpečná. Odpověď záleží na spoustě veličin. V případě méně kontaminovaného čaje a průměrného konzumenta by tento sám o sobě neměl být nebezpečný. Nicméně, pokud je takto kontaminovaný čaj podán malému dítěti, tak je riziko mnohem vyšší. Za předpokladu, že konzumujeme vysoce kontaminovaný čaj v nadměrném množství, tak už je důvod k obavám. [105]

Přestože roste povědomí o kontaminaci čaje a bylinného čaje plevellem obsahujícím PA, je třeba vyvinout další úsilí k řešení a průzkumu tohoto problému. Dále musí pokračovat úsilí o snížení obsahu nečistot v čaji a bylinách pro bylinné čaje, aby byla hladina PA ve finálních výrobcích nižší. [105]

4.2.3 Doplnky stravy

Doplnky stravy se v dnešní době těší velké oblibě lidí po celém světě. Kromě přípravků obsahujících koncentrované minerální látky nebo vitaminy vzrostla poptávka také u doplňků na bázi bylin nebo rostlin. Tyto mohou obsahovat nejen sloučeniny s možnými přínosy pro zdraví, ale také potenciálně škodlivé složky, a to právě PA, jelikož v minulosti obsahovaly rostlinné doplňky stravy vysoký obsah těchto látek. [56]

Dle výzkumu Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA; z angl. European Food Safety Authority) z roku 2016 byly u doplňků stravy na bázi pylu detekovány průměrné koncentrace PA ve výši $235\text{--}253 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Podstatně vyšší koncentrace byly nalezeny u některých rostlinných extraktů jako je brutnák lékařský s obsahem až $31 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v sušině, nebo v kostivalu lékařském s obsahem až $30 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v sušině. Nejvyšší koncentrace PA byly detekovány v některých kapslových či tabletových doplňcích s rostlinným materiálem (např. Sadeč konopáč obsahoval až $2,4 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ PA). [108] Nicméně EFSA nepopsala způsob, jakým byly vzorky analyzovány.

Na druhou stranu, ve studii publikované roku 2020, zkoumal Florian Kaltner a spol. 50 doplňků stravy na bázi bylinných a včelích produktů, přičemž dospěl k naprosto odlišným výsledkům. Zatímco 62 % vzorků neobsahovalo žádné PA, 38 % vzorků obsahovalo tyto látky ve velmi nízkých koncentracích (max. $105 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$). Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC-MS/MS. [56]

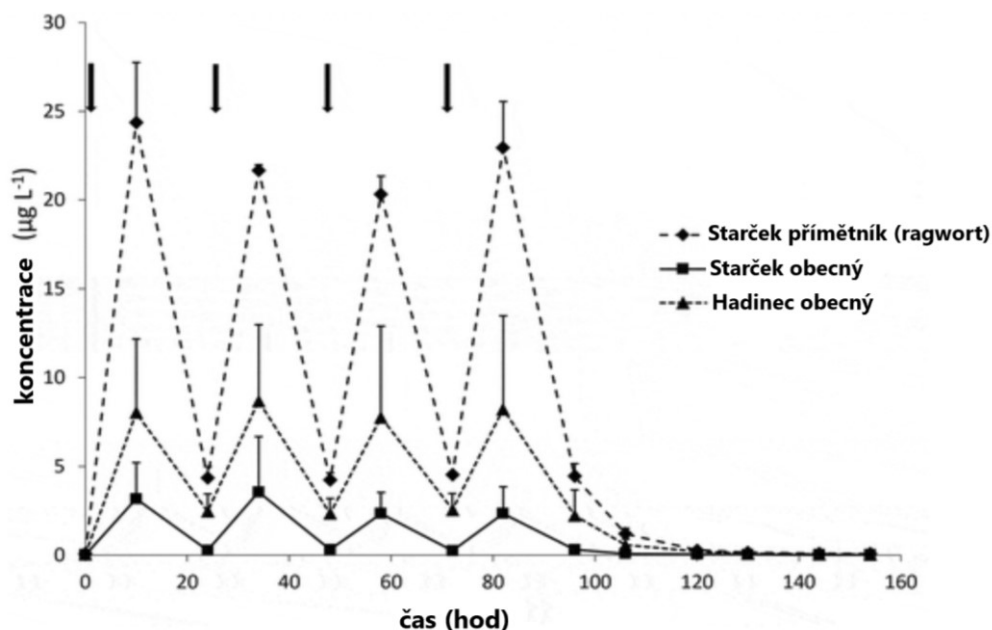
S ohledem na výše uvedené výsledky lze tedy říci, že doplňky stravy je třeba sledovat, ale pro běžného dospělého spotřebitele není důvod k obavám. Nicméně je ale třeba brát ohled na to, že PA konzumujeme spolu s dalšími potravinami. Nebezpečí těchto látek tedy tkví hlavně v kombinaci s více druhy kontaminovaných potravin, souběžně s jejich vysokým množstvím a množstvím PA v nich obsažených.

4.2.4 Živočišné produkty

Do živočichů a následně jejich produktů se PA dostávají skrze rostliny. Ukázalo se například, že mléko zvířat obsahuje PA, když konzumují rostlinný materiál, který je obsahuje. V případě člověka je to obdobné. Čili mateřské mléko také může způsobit onemocnění jater u novorozenců a kojenců v případě, že matka konzumuje kontaminované produkty. [109] I když se *N*-oxidy produkované v játrech rychle vylučují močí, tak u laktujících zvířat a člověka může být určitý podíl izolován ve vodné fázi mléka. [97]

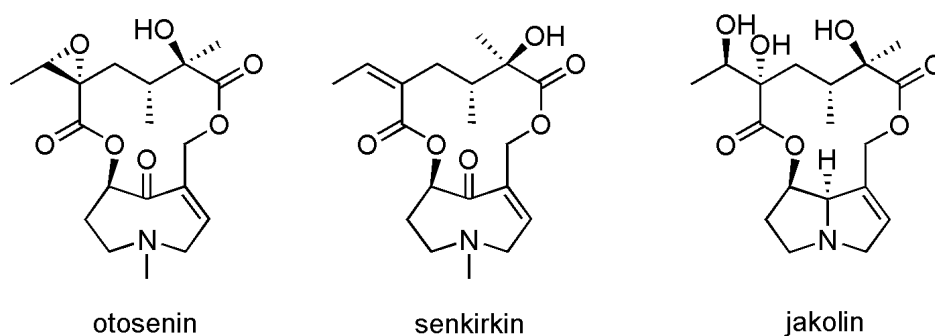
Výzkumná skupina Patrika Muldera zkoumala přenos PA z kontaminovaného krmiva do mléka, a to tak, že byly krávy po dobu tří týdnů krmeny zvyšujícím se množstvím (50–200 g denně) sušeného ragwortu (*Senecio*). U mléka byl zjištěn výskyt PA, přičemž hlavní složkou byl jakolin, což je zvláštní, jelikož přítomnost jakolinu v ragwortu činila minoritní zastoupení a překvapivě se v něm téměř nevyskytovaly *N*-oxidy. Do mléka se přeneslo přibližně pouze 0,1 %, a to skrze jejich značnou metabolizaci. [110]

V práci publikované roku 2020 autoři uvádějí jaký má vliv krmení kontaminovaným krmivem na hladinu PA v mléce krav. [111] Nejvyšší hladiny byly zjištěny u směsi ragwort, a to kolem $22 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, následovalo krmivo s hadincem obecným ($8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a nejméně obsahoval starček obecný ($3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Hladiny PA byly vždy vyšší večer než ráno a došlo se vždy před podáním krmiva, a to ráno po dobu 4 dnů. V případě starčku obecného byly hladiny ráno prakticky nezjistitelné. Na Obrázek 25 je znázorněna celková koncentrace PA v mléce, přičemž krávy byly krmeny vždy 200 g směsi ragwort, starčku obecného nebo hadince obecného.



Obrázek 25 Celkové koncentrace PA v mléce dojníc (upraveno dle citace [111]).

Ve studii publikované úřadem EFSA byly PA zjištěny v 6 % vzorků mléka, a to v koncentracích 0,05–0,17 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejčastěji se vyskytujícími PA byly senkirkin (Obrázek 26), otosenin (Obrázek 26), jakolin (Obrázek 26), lykopsamin (Obrázek 18, str. 32), retrorsin (Obrázek 10, str. 20) a echimidin (Obrázek 9, str. 19). [112]



Obrázek 26 Strukturní vzorce otoseninu, senkirkinu a jakolinu.

V další práci, publikované Monique de Nijsem a spol., byla pozornost zaměřena na smetanu, mléko a sýry, a k tomu i na citlivost PA při technologickém zpracování. [79] V rámci této studie byla koncentrace PA ve smetaně oproti termizovanému a odstředěnému mléku mírně snížena, což se nejeví jako příliš překvapivé, jelikož PA jsou velmi dobře rozpustné ve vodě. Zároveň bylo zjištěno, že ohřev pasterizovaného mléka (76 °C; 15 s) a UHT sterilizovaného mléka (140 °C; 4 s) nemá žádný vliv na koncentraci PA v konečných

produktech. Nicméně fermentace do jisté míry působí inhibičně, jelikož fermentací jogurtu bylo dosaženo snížení koncentrace PA o 27 %. Je to pravděpodobně zapříčiněno aktivitou bakterií mléčného kvašení, případně ještě v kombinaci s nízkým pH. Nejvíce obsaženým PA byl jakolin (Obrázek 26) (68–73 %), dále otosenin (Obrázek 26), jakobin (Obrázek 19, str. 34) a nakonec dehydrojakolin (všechny s obsahem 4–6 %). Podobné výsledky lze nalézt také ve studii podporované úřadem EFSA, kdy nebyly zaznamenány u žádného z 25 vzorků jogurtů získaných z maloobchodu koncentrace PA vyšší, než činila mez kvantifikace (LOQ). Zároveň byl v rámci této studie zkoumán i syrovátkový prášek, jelikož se často používá jako přísada do kojenecké výživy. Výsledkem bylo, že ve všech vzorcích se PA vyskytovaly v podlimitních hodnotách. [112] U sýrů, kterým se věnoval Monique de Nijs a spol. ve výše zmíněné publikaci, [79] byl rovněž, stejně jako u jogurtů, zaznamenán pokles PA, kdy se během 6týdenního zrání sýrů celková koncentrace PA snížila o 38 %. Tento pokles je pravděpodobně opět spjat s mikrobiální fermentací. Koncentrace PA v syrovátce a sýru byla srovnatelná. Nejvíce obsaženým PA ve zkoumaných sýrech byl jakolin (76–80 %), dále jakobin (6–10 %), otosenin a retrorsin (3–4 %).

V práci publikované G. J. Diazem a spolupracovníky [113] bylo prokázáno, že může docházet k přenosu PA z krmiva na vejce. Rezidua těchto látek nalezená ve vejcích byla především základního typu PA s pouze velmi malým množstvím PANO.

Studie přenosu PA skrze vejce a maso, kterou publikoval v roce 2016 Patrick P. J. Mulder a kolegové [114] naznačuje, že příjem kontaminovaných bylin nosnicemi může vést k vysokým hladinám těchto alkaloidů ve vejcích a mase. V rámci další studie, která byla publikována o rok později, [16] byla zjištěna kontaminace PA pouze u dvou z 205 analyzovaných vzorků a stanovené hladiny PA byly velmi nízké (0,10–0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Skladba PA byla podobná těm, které byly nalezeny v mléce. Z tohoto lze usoudit, že krmivo kuřat téměř nebývá kontaminováno PA.

Stejným způsobem jako se PA přenáší na rostliny, se mohou přenášet také do masa. Nicméně ohledně tohoto přenosu bylo provedeno velmi málo studií. V rámci experimentu z roku 1971 byla štěňata krmena vařeným masem ze zvířat otrávených druhem *Trichodesma*, který obsahoval dehydro PA. To mělo za následek smrt nebo vznik nevratných patologických změn testovaných zvířat během 3–4 měsíců, přičemž se zjistilo, že v mase nebyly vařením zničeny toxické zbytky alkaloidů. [97] Ve výše uvedené studii Patricka P. J. Muldera, [114] provedené na slepicích, bylo zjištěno, že PA zůstávají v tkáních i několik dalších týdnů po vyřazení těchto kontaminantů z krmiva. Dále také byly

zaznamenány mnohem vyšší hladiny PA v játrech a ledvinách než v prsním svalu, což je logické, vzhledem k toxickým účinkům právě na tyto orgány.

4.2.5 Limity pyrrolizidinových alkaloidů v potravinách

Od července 2022 vstoupily v Evropě v platnost maximální hladiny PA v některých potravinách dle Nařízení evropské komise 2020/2040, jak ukazuje Tabulka 3. [107]

Tabulka 3 Nařízení evropské komise pro maximální limity pyrrolizidinových alkaloidů v některých potravinách (upraveno dle citace [107]).

Bod	Potravina	Max. součet PA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
1	Bylinné čaje (sušený produkt), vyjma uvedených v bodě 2 a 4	200
2	Bylinné čaje z rostliny rooibos, anýzu, meduňky, heřmánku, tymiánu, máty peprné, aloisie citronové (sušeného produktu) a směsi složené výhradně z těchto sušených bylin, vyjma uvedených v bodě 4	400
3	Čaj a aromatizovaný čaj (sušený), vyjma uvedených v bodě 4	150
4	Čaj, aromat. čaj a bylinné čaje pro kojence a malé děti (sušený)	75
5	Čaj, aromat. čaj a bylinné čaje pro kojence a malé děti (tekuté)	1,0
6	Doplňky stravy obsahující bylinné složky včetně extraktů, vyjma uvedených v bodě 7	400
7	Doplňky stravy na bázi pylu, pyl a produkty z pylu	500
8	Listy brutnáku lékařského (čerstvého, zmrazeného) uváděné na trh pro konečného spotřebitele	750
9	Sušené byliny, vyjma sušených bylin uvedených v bodě 10	400
10	Brutnák, libeček, majoránka a oregano (sušené) a směsi složené výhradně z těchto sušených bylin	1000
11	Semena římského kmínu (koření)	400

5 MOŽNOSTI STANOVENÍ PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ

Z důvodu toxicity PA je důležité kontrolovat jejich výskyt v potravinách a surovinách používaných pro jejich výrobu. Toho lze dosáhnout prostřednictvím vývoje citlivých a selektivních analytických metod, díky kterým je možno tyto sloučeniny identifikovat a kvantifikovat. [1, 115] V současnosti je známo více než 660 různých PA (včetně *N*-oxidů), nicméně k dispozici je pouze omezený počet referenčních sloučenin (standardů). [96]

Analýzu PA lze rozdělit do tří fází jejichž účinnost závisí na mnoha faktorech:

- extrakce,
- separace,
- identifikace. [59]

5.1 Extrakce z potravinářské matrice

Extrakční metoda musí zajistit účinnou extrakci PA i PANO, jelikož se běžně vyskytují současně. Z toho důvodu převládá klasická extrakce alkaloidů středně polárními až polárními organickými rozpouštědly nebo okyselenými vodnými roztoky. PANO jsou polární molekuly, tudíž mohou být snadno extrahovány polárními rozpouštědly, jako je methanol nebo zředěné vodné kyseliny. [97] Podmínky extrakce mohou ovlivnit kvalitu a množství výtěžku PA, např. teplota extrakce může ovlivnit proces extrakce. [78]

Extrakce PA z různých vzorků závisí na formě a typu sledovaného alkaloidu, jakož i na složitosti použité matrice. Proces extrakce zpravidla zahrnuje tři fáze, kterými jsou příprava vzorku, samotná extrakce a purifikace. [59]

5.1.1 Příprava vzorku

Příprava vzorku může zahrnovat jednoduché řezání rostlinného produktu, nebo také homogenizaci, či rozmělnění zmrazeného nebo sušeného materiálu za účelem zvětšení povrchu pro extrakci. [59]

Důležité je zajistit, aby byl vzorek dostatečně velký a také homogenní, jelikož některé části rostlin, jako jsou semena nebo fragmenty kořenů, mohou obsahovat velmi vysoké množství PA. Homogenizaci vzorku lze dosáhnout různými technikami mletí a míchání. [115]

Vzorky rostlin mohou být smíchány v čerstvém stavu, a proto mohou být celé porce homogenizovány v extrakčním rozpouštědle. V jiných případech se může jako vhodnější jevit vzorek zmrazit a smíchat se suchým ledem nebo tlučkem ve třecí misce s kapalným dusíkem. Rostliny lze sušit na vzduchu, ve vakuu či v sušárně. Bohužel nebyla provedena žádná srovnávací studie o změnách ve složení PA vyvolaných těmito metodami sušení. [115]

5.1.2 Extrakce

Je známo mnoho různých technik vhodných pro extrakci PA z léčivých rostlin, přičemž většina z nich je založena na maceraci nebo perkolaci. Tyto zároveň představují dva hlavní způsoby extrakce. Během macerace je vzorek máčený čili nasáklý rozpouštědlem (extrakce diskontinuální), zatímco během perkolace rozpouštědlo protéká rostlinným materiálem (extrakce kontinuální). [78]

Jak PA, tak PANO jsou velmi omezeně rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (např. hexanu). Nejlépe se extrahují polárními rozpouštědly (např. methanolem), případně vodnými roztoky zředěných kyselin. Tato rozpouštědla rozpouštějí PA i PANO relativně snadno. [115]

V současnosti je stále hojně používanou extrakce typu pevná látka–kapalina, a to přesto, že je známo a popsáno mnoho dalších moderních a mnohdy i účinnějších extrakčních a purifikačních technik, jako je extrakce na pevné fázi (SPE) nebo postup známý pod zkratkou QuEChERS. [59]

QuEChERS (z angl. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), lze definovat jako rychlou, jednoduchou, ekonomicky nenáročnou, účinnou, robustní a bezpečnou extrakční metodu. Jedná se o jednoduchou extrakční techniku, [116] která se v poslední době stala populární při analýze širokého spektra analytů v obrovském spektru vzorků. Výhodou této metody je použití malého množství materiálu a rozpouštědla, a zároveň zkrácení času potřebného k přípravě vzorku. [117] Zahrnuje současnou extrakci a čištění vzorků pro stanovení více analytů současně. [118] Tato extrakční metoda, jak plyne z jejího názvu, má také vysokou účinnost. [117]

Extrakce na pevné fázi (SPE, z angl. Solid Phase Extraction), případně mikroextrakce na pevné fázi (SPME, z angl. Solid Phase MicroExtraction) se často provádí za účelem získání obohacených frakcí PA. [119] SPE je rychlá, snadná a k přírodě šetrná metoda, a to díky snížené spotřebě rozpouštědla ve srovnání s extrakcí typu kapalina–kapalina. Zároveň je ekonomicky dostupná, umožňuje snadnou automatizaci a kratší dobu analýzy, a také je

vhodnější pro vzorky s nízkou koncentrací analytu. [120] Bylo zjištěno, SPE se silnou katexovou výměnou je vhodná pro rostlinné extrakty a pro mnoho hepatotoxických druhů PA a PANO. Dále také poskytuje účinné zachycení z matric na bázi medu a následné uvolnění do amoniakového methanolu. [104]

Často používaná je také extrakce typu kapalina–kapalina. Z kapalného roztoku se analyt převede do jiného kapalného rozpouštědla, a to manuálně protřepáním obou kapalin v děličkách nebo v extraktorech, kdy se analyzuje rozpouštědlo s analytem. V případě extrakce PA lze použít například směs kyseliny sírové a hexanu v poměru 2:3. [121]

U velmi malých vzorků, například hmyzu, se PA nejlépe extrahují pomocí kyselého methanolu, protože rozpouštědlo lze použít jako konzervační médium. Před extrakcí může být hmyz po zmrazení v kapalném dusíku rozemlet na prášek. [122]

5.1.3 Purifikace

Postupy čištění se považují za nezbytné pro většinu rostlinných a potravinářských matric analyzovaných s cílem stanovit obsah PA. Pro některé vzorky, jako je např. med, může být extrakce a čištění provedeno v jednom kroku. [115]

Terciární PA i jejich *N*-oxidy jsou relativně polární, tudíž jejich roztoky v okyselené vodě nebo ve směsi vody s methanolem lze snadno vyčistit od nepolárních složek, jako jsou tuky, vosky či terpeny, a to promytím hexanem nebo petroletherem. [115]

5.2 Separace a identifikace

Některé separační techniky (především kapalinová a plynová chromatografie či elektroforetické metody) jsou často spojeny s technikou zabezpečující identifikaci daného analytu (detektor), např. UV-Vis, plamenově-ionizační detektor, hmotnostně-spektrometrický detektor atp. Naproti tomu, jiné metody, jako například nukleární magnetická rezonance (NMR) či infračervená spektrometrie (IČ) představují techniky čistě identifikační.

Po extrakci vzorku následuje provedení separace a identifikace jednotlivých látek ve vzorku se nacházejících. K analýze PA lze použít mnoho separačních technik, přičemž v současné době nejpoužívanějšími jsou metody chromatografické, a to díky jejich snadnému použití, časové a ekonomické nenáročnosti, a vysoké míře reprodukovatelnosti. Standardně používanými chromatografickými metodami jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC), které lze kombinovat s různými

detekčními technikami. [59, 78] Jako nejúčinnější technika se v případě separace a identifikace PA zdá být vysokoúčinná kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). [59, 78, 123, 124]

Mezi další relativně často používané separační metody pro analýzu PA patří kapilární elektroforéza (CE), jejíž separace je založena na migraci molekul v elektrickém poli. CE byla použita jen při několika stanoveních PA, [59, 78, 115] jelikož má velmi omezené použití pro stanovení PA, a to z důvodu nižší citlivosti při stanovení více druhů těchto alkaloidů. [122] Dále to může být kapková protiproudová chromatografie (DCCC, z angl. Droplet Countercurrent Chromatography) sloužící jako automatizovaná metoda separace kapalina–kapalina a různé techniky elektrokinetické chromatografie (MEKC, z angl. Miscellaneous Electrokinetic Chromatography), které jsou založeny na kombinaci elektroforetického a chromatografického principu. [59, 78]

Vyjma hmotnostní spektrometrie se k detekci PA používají také techniky kolorimetrické, které byly vyvinuty pro detekci 1,2-nenasycených PA a PANO. PA poskytují barevné reakce s různými činidly, které se obvykle používají k detekci alkaloidů. [115] Dalšími detekčními metodami mohou být nukleární magnetická rezonance, imunologické techniky nebo techniky založené na UV-Vis spektrometrii. [59, 78]

5.2.1 Odstředivá protiproudá separace

Odstředivá protiproudá separace (CCCS, z angl. Centrifugal Countercurrent Separation) se dělí na protiproudou chromatografii (CCC, z angl. Countercurrent Chromatography) a odstředivou dělicí chromatografii (CPC, z angl. Centrifugal Partition Chromatography). Pro CCS jsou dostupné automatizované a relativně uživatelsky přívětivé přístroje, jejichž výhodou jsou nízké tlaky, vysoké průtoky a spousta druhů rozpouštědel, které mohou být pro analýzu použity. [125]

CCC je dělicí chromatografie ve fázích kapalina–kapalina, při níž se používají dvě nemísitelné rozpouštědlové fáze, z nichž jedna působí jako stacionární a druhá jako mobilní fáze. Jelikož zde není pevná fáze, mizí ztráty způsobené nevratnou absorpcí na pevnou stacionární fázi. Z tohoto důvodu je také CCC velmi oblíbenou a používanou separační a purifikační technikou v analýze přírodních produktů. Novějšími variantami CCC je vysoce účinná protiproudá chromatografie (HPCCC, z angl. High Performance Countercurrent Chromatography) a vysokorychlostní protiproudá chromatografie (HSCCC, z angl. High

Speed Countercurrent Chromatography), jejichž benefitem jsou vyšší rychlosti separace. [121]

5.2.2 Vysoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

O používání vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) je stále větší zájem při separaci PA, zejména proto, že přístroje na bázi LC-MS jsou relativně dostupné. [59] Tento typ analytických metod překonává nižší mez detekce (LOD) a může poskytnout uživateli informace nejen o molekulové hmotnosti dané molekulární entity, ale také o její struktuře. [126] Její obrovskou výhodou je možnost současné detekce PA a PANO. [97]

Použití kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením poskytuje vysokou citlivost a přesné informace o hmotnosti, které jsou výhodné jak při detekci neznámých struktur, tak při stanovení právě charakteru pyrrolizidinu. [18]

Analýza LC-MS nevyžaduje redukci PANO na PA, tudíž je nižší počet kroků přípravy vzorku, a také menší pravděpodobnost degradace alkaloidů. [18] Nicméně, vzhledem k relativně náročné přípravě vzorků a mnohdy složité interpretaci získaných dat, je tato metoda časově i pracovně náročná. [124] V posledních letech se LC-MS používá ke stanovení širokého spektra sloučenin obsažených v rostlinách. [18] Její výhodou oproti GC je účinná separace a detekce bez nutnosti derivatizace, [59] čili úpravy některé z vlastností vzorku pro správné provedení analýzy.

V současnosti je také velmi používaná jednoduchá a citlivá metoda kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). [127] LC-MS/MS je pravděpodobně nejvhodnější metodou pro analýzu PA, jelikož extrakt může být analyzován přímo a poskytuje cenné informace, které jsou důležité při návrhu struktury dané látky a z toho plynoucího hodnocení toxicity. [123] Obvykle se analýza provádí pomocí hmotnostního analyzátoru na bázi trojitého kvadrupólu v režimu monitorování více reakcí (MRM, z angl. Multiple Reaction Monitoring), a to z důvodu vyšší citlivosti pro stopovou analýzu. Režim elektrosprejové ionizace (ESI) je výhodnější než chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), protože ESI umožňuje snadnější ionizaci polárních PANO. [128]

Matteo A. Lucchetti a kol. [101] tuto metodu použili pro kvantifikaci šesti různých PA a PA *N*-oxidů přítomných v *Echium vulgare*, přičemž koncentrace PA vyskytujících se v této rostlině byla v rozmezí od 0,002 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ do 0,153 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Technika LC-MS/MS byla také použita v případě Yan Zhanga a spolupracovníků [90], jejichž cílem bylo analyzovat PA v bylinách *Eupatorium fortunei* a léčivých přípravcích z nich. Prostřednictvím této metody identifikovali celkem osm PA, přičemž intermedin *N*-oxid a lykopsamin *N*-oxid měly nejhojnější zastoupení. Také zjistili, že celkové množství PA se pohybuje od 0,18 do 62 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ u 30 šarží bylin a od 0,86 do 37 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ u 4 komerčních výrobků dostupných běžně na trhu.

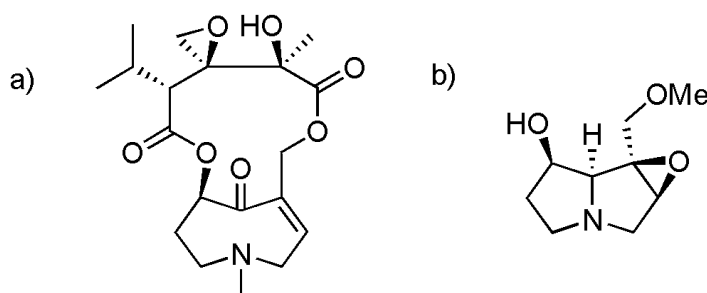
Bharathi Avula a kolegové [129] ve své studii použili spektrometr vybavený hybridním hmotnostním analyzátozem označovaným jako Q-TOF (kvadrupól-analyzátor doby letu). Toto spojení poskytlo účinný nástroj pro rychlý screening PA ze vzorků rostlin a doplňků stravy. Výsledky provedených experimentů ukázaly, že metoda byla citlivá, selektivní a poskytovala účinný přístup k charakterizaci PA a *N*-oxidů z rostlin a doplňků stravy v jediném chromatografickém stanovení.

5.2.3 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Častou kombinací používanou pro analýzu PA je rovněž plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), standardně spojená s elektronovou ionizací. [97] Jedná se o metodu, jejíž výhodou je vysoká citlivost. Naopak její zásadní nevýhodu představují vysoké teploty používané při nástřiku vzorku do GC (~200 °C), které mohou zapříčinit degradaci některých molekul ve vzorku se nacházejících. [126] Tuto metodu nelze použít k analýze PANO, protože tyto jsou při výše uvedených teplotách nestabilní. GC může být aplikována na většinu PA s výjimkou těch otonecinového typu. [122]

Mimo hmotnostní spektrometrie se GC také velmi často užívá ve spojení s plamenově ionizačním detektorem (FID) a o něco méně ve spojení s detektorem dusíku a fosforu (NPD).

GC-MS použila Mary T. Fletcher a kolegové [81] pro stanovení PA z *Crotalaria medicaginea*, jejichž struktura byla zjištěna pomocí MS a NMR analýzy, přičemž byla využita ^1H , ^{13}C a 2D NMR. První PA byl identifikován jako 1 β ,2 β -epoxy-7 β -hydroxy-1 α -methoxymethyl-8 α -pyrrolizidin, který nevykazuje hepatotoxitu. Druhým izolovaným alkaloidem byl nový makrocyclický diester otonecinu, který dostal jméno kromedin. Strukturní vzorce obou sloučenin lze pozorovat na Obrázek 27.



Obrázek 27 a) Kromedin, b) 1β,2β-epoxy-7β-hydroxy-1α-methoxymethyl-8α-pyrrolizidin (upraveno dle citace [81]).

Mary T. Fletcher tuto metodu použila i o dva roky dříve [83] pro identifikaci a kvantifikaci PA z druhů *Crotalaria*, kdy bylo identifikováno 33 různých alkaloidů napříč 24 studovaných taxonů.

5.2.4 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je založena na interakci elektromagnetického vlnění v oblasti krátkých radiových vln s jádry měřené látky v magnetickém poli, přičemž aktivní jsou pouze jádra s nenulovým spinem, jelikož právě ta absorbují radiové záření. Je to rychlá a nedestruktivní metoda sloužící zejména pro strukturní identifikaci, kdy i k charakterizaci složitých molekul stačí pouze několik miligramů vzorku. [62] Používá se převážně při strukturním objasnění purifikovaných PA, a to zejména při použití ^1H a ^{13}C NMR experimentů. Kvantitativní stanovení dehydroPA obvykle probíhá pomocí ^1H NMR spektroskopie. ^1H NMR může poskytnout kvalitativní informace rychleji a z menšího množství vzorku než ^{13}C NMR. V současnosti se pro analýzu PA používají moderní NMR přístroje pracující při vysokých frekvencích (tj. >500 MHz). [97]

Vzhledem ke komplikovanější struktuře řady derivátů PA se pro jejich analýzu používá i 2D NMR. Tato technika poskytuje pokročilejší informace o jejich struktuře a vztazích mezi atomovými jádry. Jedná se o velmi pokročilou techniku, která vyžaduje zkušenost pracovníka a specializované vybavení. Tuto metodu, spolu s dalšími, použil např. Shuai Huang a kolegové [95] pro objasnění struktury PA z *Liparis nervosa*.

Ramon Prata Oliveira a spolupracovníci [62] použili 1D NMR a 2D NMR pro zjištění struktury nově objeveného ethylkrotalinu, izolovaného z *C. paulina*.

V bachoru mrtvých ovcí byla ve velkém množství nalezena semena *C. retusa*. V.M.T. Nobre a kolegové [84] použili ^1H a ^{13}C NMR pro identifikaci alkaloidů přítomných

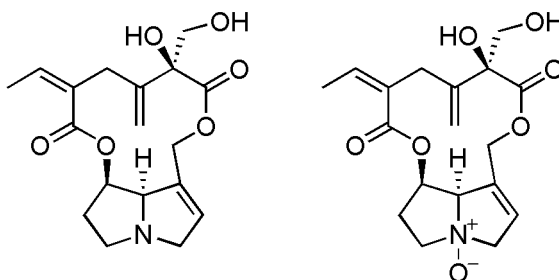
v semenech. Zjistilo se, že ovce byly otráveny monokrotalinem, jehož koncentrace v semenech byla 1,4 %. Z 640 g semen bylo v ethanolickém extraktu získáno 53,4 g, v alkaloidové frakci 10,5 g a konečné množství monokrotalinu bylo 9 g.

5.2.5 Imunologické metody

Imunologické testy jsou rozsáhle používané a známé. Byly vyvinuty významné laboratorní metody pro rychlou, selektivní a citlivou detekci analytů v komplexních matricích. Imunotesty jsou užívané při detekci adukovaného proteinu, který vzniká při biologické aktivaci u pokusných zvířat a exponovaných lidí. Adukovaný protein je takový, který se připojil k cílové molekule. Pomocí společného strukturního rysu mnoha toxických PA, necinové báze retronecinu, vědci prokázali, že zvýšené protilátky retronecin-protein konjugátu mohou v ELISA (vysvětleno níže) detekovat retronecin či monokrotalin. [97] Imunotesty nalézají také časté využití v klinické praxi, jelikož jsou snadno proveditelné a odpadají požadavky na drahé vybavení. [130] Provádějí se ve vodných médiích a jsou vhodné pro analýzu toxinů v biologických vzorcích. [131]

ELISA (z angl. Enzyme-linked immunosorbent assay) je enzymová imunoanalýza, která byla vyvinuta jako alternativní metoda k tradičním analytickým technikám detekce PA. Její výhodou je minimální náročnost na přípravu vzorků a možnost zpracovávat mnoho vzorků současně. [131]

Stephen T. Lee spolu s kolegy [131] popsal dvě kompetitivní inhibiční ELISA. První test je specifický pro terciární báze PA a druhý demonstruje zkříženou reaktivitu na PANO. Metoda byla použita pro detekci a kvantifikaci riddelliinu v krvi skotu a riddelliinu spolu s jeho *N*-oxidem (Obrázek 28) ve vzorcích rostlin. Riddelliin a riddelliin *N*-oxid nejsou dostatečně velké molekuly, aby byly samy o sobě imunogenní. Riddelliin byl proto konjugován na protein s vysokou molekulovou hmotností, aby vyvolal imunitní odpověď.



Obrázek 28 Riddelliin a riddelliin *N*-oxid.

5.2.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika používaná k identifikaci chemických sloučenin a stanovení jejich hmotnosti. Principem metody je separace molekulových iontů na základě jejich hmotnosti a náboje a následné detekování těchto iontů. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Nejpoužívanější hmotnostní analyzátoři jsou kvadrupólový analyzátor, tojový kvadrupólový analyzátor, iontová past a analyzátor doby letu.

Při analýze pyrrolizidinových alkaloidů pomocí hmotnostní spektrometrie se obvykle používá tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), nejlépe ve spojení s MRM. Tato technika umožňuje identifikaci a kvantifikaci pyrrolizidinových alkaloidů ve vzorcích. Anja These a kolegové [132] použili v roce 2013 poprvé MS/MS ve spojení s MRM pro screening PA. Zjistili totiž, že MRM využívá podobnou základní strukturu všech PA, což vede ke společnému, a tedy předvídatelnému chování fragmentace. Na tomto základě byla vyvinuta metoda, která screenuje struktury PA a umožňuje detekci jednotlivých PA až do nízkých koncentrací v řádech $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Tato metoda umožňuje nejen detekci každého jednotlivého PA, ale také stanovení celého obsahu PA bez nutnosti analytických standardů každé PA.

Počátek 21. století lze považovat za určitý mezník v oblasti hmotnostní spektrometrie (MS), a to díky zavedení ambientních ionizačních technik. [133] K těmto technikám patří například přímá analýza v reálném čase (DART, z angl. Direct Analysis in the Real Time), která probíhá za atmosférického tlaku nebo desorpční elektrosprejová ionizace (DESI, z angl. Desorption Eletspray Ionisation), které se používají ve přímo spojení s hmotnostní spektrometrií. DART je založena na principu ionizace inertního plynu (helia nebo dusíku) za účelem vytvoření proudu plazmového plynu, jeho zahříváním proti vzorku, desorbováním a ionizací vzorku, který se používá přímo ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Ve srovnání s konvenčními postupy nevyžaduje DART-MS vakuum v části iontového zdroje a je snadné přímo ionizovat vzorek bez nutnosti další chromatografické separace. Pomocí DART-MS s vysokou účinností a jednoduchou obsluhou je možné provést kvalitativní analýzu v reálném čase a získat výsledky během několika sekund. [123] Kombinace DART a různých hmotnostních spektrometrů umožňuje analyzovat vzorky potravin bez nutnosti jejich předchozí úpravy. [124] Mezi nevýhody této metody patří komplikovanost získaných spekter, omezená citlivost a selektivita.

Yilin Chen s kolegy [123] použil DART-MS pro rychlou identifikaci a stanovení šesti PA v *Gynura japonica*, tabletách Qianbai Biyan, granulích Huahong a kravském mléce. Výsledky DART-MS ukazují, že v *Gynura japonica* bylo detekováno $121 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ senecioninu a $234 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ senecifylinu, v tabletách Qianbai Biyan bylo detekováno $37 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ adonifolinu, granule Huahong obsahovaly $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ senkirkinu a ve vzorcích mléka nebyly zjištěny žádné PA. DART-MS analýza poskytla velmi podobné výsledky jako HPLC-MS, s korelačním koeficientem (R^2) $> 0,98$.

5.2.7 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je analytická technika, která se používá k měření absorpce světla či záření elektromagnetického spektra sloučeninami ve vzorcích. Tato metoda je založena na principu, že molekuly absorbují světlo při specifických vlnových délkách, což umožňuje identifikaci a kvantifikaci sloučenin ve vzorcích. Nejčastěji se používá UV-Vis spektrofotometrie, což je technika, která měří absorpci světla ve viditelné (Vis) a ultrafialové (UV) oblasti spektra. Při UV-Vis spektrofotometrii se světlo o určité vlnové délce projde vzorkem a měří se intenzita světla po průchodu vzorkem. Výsledkem je spektrum absorpce, které ukazuje, jaká část světla byla absorbována vzorkem při různých vlnových délkách.

Spektrofotometrická detekce dehydro PA a PANO, mimo PA otonecinového typu, je založena na jejich barevné reakci s činidli obsahujícími primární a sekundární aminy. Tyto metody nejsou schopny kvantifikovat jednotlivé PA, ale umožňují stanovení celkového obsahu dehydro PA. [97] V UV spektrometrii se používá Erlichovo činidlo se spektrofotometrickou detekcí ke kvantitativnímu měření PA v pšenici a mouce. [115] Terciární PA se oxidují na odpovídající PANO, dále probíhá dehydrogenace na pyrroly, a nakonec se spojí s Ehrlichovým činidlem za vzniku purpurového zbarvení, které lze měřit spektrofotometricky při 563 nm. [97]

Možností je také použití methylované, která je dobře rozpustná v organických rozpouštědlech a tvoří žlutý komplex. Methylovaná se uvolňuje z organického roztoku při ošetření silnou kyselinou a měří se spektrofotometricky při 525 nm. [97, 134]

6 VÝHLED DO BUDOUCNA

Pyrolizidinové alkaloidy a rizika jejich nevědomé konzumace se začínají dostávat do povědomí široké veřejnosti, načež je třeba v tomto pokračovat, aby se snížila rizika spojená s jejich konzumací, včetně otrav a úmrtí lidí i zvířat.

Z hlediska potravinářství, je potřeba pečlivě sledovat PA v rostlinách, kontrolovat jejich přenos na potraviny, případně regulovat jejich množství, což je velmi důležité pro bezpečnost potravin a zdraví spotřebitele.

V budoucnosti je třeba dalšího vývoje a zlepšení analytických metod používaných pro detekci a identifikaci PA v potravinách, potravinových doplňcích i rostlinách. . Tato zlepšení zahrnují zvýšení citlivosti a selektivity detekce PA pomocí technik jako je kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), jelikož tato se jeví jako nejvhodnější. [59, 64, 78] Nicméně je třeba vyvinout snahu o nalézání či zlepšování i jiných metod stanovení PA a PANO.

V neposlední řadě se jako nezbytné jeví pokračovat ve zkoumání těchto látek, jelikož stále chybí mnoho informací, a to například o jejich celkové biosyntéze. Z důvodu významné farmakologické aktivity a možného budoucího léčebného využití některých PA je důležité udržovat jejich biologickou aktivitu, a naopak snížit toxicitu na minimum. Zároveň je třeba objevovat a studovat prozatím neznámé či méně známé druhy PA, a to jak z hlediska jejich potenciálního využití v medicíně, tak i jejich možných nebezpečných účinků.

ZÁVĚR

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou skupinou přírodních látek, které se vyskytují v některých rostlinách. Tyto látky mohou negativně ovlivňovat lidské zdraví, především s ohledem na jejich hepatotoxicitu, karcinogenitu a nebezpečí vrozených vad či úmrtí plodu.

Toxicita této třídy alkaloidů pro člověka a mnoho zvířat obvykle převyšuje jejich možné léčebné výhody. Bez ohledu na to nelze popřít, že PA mají zajímavé biologické účinky a není tak vyloučeno, že by mohly být některé z nich v budoucnu použita jako léčiva. [59, 64]

PA jsou často přítomny v rostlinách jako jsou starček, hadinec, otočník a další. Tyto rostliny mohou kontaminovat potravu zvířat i lidí, přičemž se mohou dostávat do jejich mléka či masa. Konzumace potravin nebo potravinových přísad obsahujících PA může být zdraví škodlivá.

Kontrolní orgány v mnoha zemích sledují a omezují obsah PA v potravinách. Metody detekce jsou na velmi dobré úrovni a často se používají pro kontrolu potravinových výrobků, avšak stále je prostor pro jejich zdokonalování. Konzumace potravin s nízkým obsahem PA je považována za bezpečnou, přičemž nadměrná expozice PA může způsobit zdravotní problémy.

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou stále předmětem výzkumu a zjišťují se nové informace o jejich vlastnostech a možných rizicích. Je velmi důležité dbát na dodržování doporučení týkajících se obsahu PA v potravinách a sledovat aktuální poznatky vycházející z výsledků vědecko-výzkumné činnosti této oblasti se věnující.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Natalia CASADO, Sonia MORANTE-ZARCERO, Isabel SIERRA. The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview. *Trends in Food Science & Technology* **2022**, *120*, 123–139. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.007>
2. O.C. SEREMET, O.T. OLARU, C.M. GUTU, G.M. NITULESCU, M. ILIE, S. NEGRES., C. E. ZBARCEA, C. N. PURDEL, D. A. SPANDIDOS, A. M. TSATSAKIS, M. D. COLEMAN, D.M. MARGINA. Toxicity of plant extracts containing pyrrolizidine alkaloids using alternative invertebrate models. *Molecular Medicine Reports*. **2018**, *17* (6), 7757-7763. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8795>
3. Chuanying FANG, Alisdair R. FERNIE, Jie LUO. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. *Trends in Plant Science*. **2019**, *24* (1), 83–98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.006>
4. B.-E. VAN WYK, M.A. STANDER, H.S. LONG. *Senecio angustifolius* as the major source of pyrrolizidine alkaloid contamination of rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *South African Journal of Botany*. **2017**, *110*, 124–131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.01.013>
5. Rute MOREIRA, Fátima FERNANDES, Patrícia VALENTÃO, David M. PEREIRA, Paula B. ANDRADE. *Echium plantagineum* L. honey: Search of pyrrolizidine alkaloids and polyphenols, anti-inflammatory potential and cytotoxicity. *Food Chemistry*. **2020**, *328*, 127169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127169>
6. Wei ZHANG, Wenbei HUAI, Yi ZHANG, Jincan SHEN, Xunyou TANG, Xiujuan XIE, Ke WANG, Huajun FAN. Ultra-Performance Liquid Chromatography Hyphenated with Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Necine-Core-Structure Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria sessiliflora* L. without all Corresponding Standards. *Phytochemical Analysis*. **2017**, *28* (5), 365–373. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2683>
7. Michael BOPPRÉ, Steven M. COLEGATE, John A. EDGAR. Pyrrolizidine Alkaloids of *Echium vulgare* Honey Found in Pure Pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53* (3), 594–600. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0484531>

8. Christina KAST, Verena KILCHENMANN, Hans REINHARD, Benoit DROZ, Matteo Angelo LUCCHETTI, Arne DÜBECKE, Gudrun BECKH, Otmar ZOLLER. Chemical fingerprinting identifies *Echium vulgare*, *Eupatorium cannabinum* and *Senecio* spp. as plant species mainly responsible for pyrrolizidine alkaloids in bee-collected pollen. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2018**, 35 (2), 316–327. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1378443>
9. Mengbi YANG, Jiang MA, Jianqing RUAN, Yang YE, Peter PI-CHENG FU, Ge LIN. Intestinal and hepatic biotransformation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides to toxic pyrrolizidine alkaloids. *Archives of Toxicology*. **2019**, 93, 2197–2209. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02499-2>
10. Franziska KOLREP, Jorge NUMATA, Carsten KNEUER, Angelika PREISS-WEIGERT, Monika LAHRSEN-WIEDERHOLT, Dieter SCHRENK, Anja THESE. In vitro biotransformation of pyrrolizidine alkaloids in different species. Part I: Microsomal degradation. *Archives of Toxicology Toxicology*. **2018**, 92, 1089–1097. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2114-7>
11. Birgit DUSEMUND, Nicole NOWAK, Christine SOMMERFELD, Oliver LINDTNER, Bernd SCHÄFER, Alfonso LAMPEN. Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. *Food and Chemical Toxicology*. **2018**, 115, 63–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.005>
12. Rute MOREIRA, David M. PEREIRA, Patrícia VALENTÃO, Paula B. ANDRADE. Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety. *International Journal of Molecular Sciences*. **2018**, 19 (6), 1668. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19061668>
13. Lotte JOOSTEN, Patrick P. J. MULDER, Peter G. L. KLINKHAMER, Johannes A. VAN VEEN. Soil-borne microorganisms and soil-type affect pyrrolizidine alkaloids in *Jacobaea vulgaris*. *Plant Soil*. **2009**, 325, 133–143. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9963-7>
14. Michitaka KURIMOTO, Tsung-che CHANG, Yoshitake NISHIYAMA, Takehiro SUZUKI, Naoshi DOHMAE, Katsunori TANAKA, Satoshi YOKOSHIMA. Anticancer Approach Inspired by the Hepatotoxic Mechanism of Pyrrolizidine Alkaloids with Glycosylated Artificial Metalloenzymes. *Angewandte Chemie*. **2022**, 61 (43), e202205541. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.202205541>

15. Qingsu XIA, Jian YAN, Ming W. CHOU, Peter P. FU. Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, heliotrine. *Toxicology Letters*. **2008**, 178 (2), 77–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.02.008>
16. Patrick P.J. MULDER, Patricia LÓPEZ, Massimo CASTELARI, Dorina BODI, Stefan RONCZKA, Angelika PREISS-WEIGERT, Anja THESE. Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: results of a survey across Europe. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2018**, 35 (1), 118–133. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1382726>
17. Haolei HAN, Changling JIANG, Chen WANG, Yuting LU, Ziqi WANG, Yunfeng CHAI, Xiangchun ZHANG, Xin LIU, Chengyin LU, Hongping CHEN. Dissipation pattern and conversion of pyrrolizidine alkaloids (PAs) and pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides (PANOs) during tea manufacturing and brewing. *Food Chemistry*. **2022**, 390, 133183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133183>
18. Fausto PRADA, Elena E. STASHENKO, Jairo René MARTÍNEZ. LC/MS study of the diversity and distribution of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species growing in Colombia. *Separation Science*. **2020**, 43 (23), 4322–4337. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202000776>
19. Sebastian SCHRAMM, Nikolai KÖHLER, Wilfried ROZHON. Pyrrolizidine Alkaloids: Biosynthesis, Biological Activities and Occurrence in Crop Plants. *Molecules*. **2019**, 24 (3), 498. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24030498>
20. Yan CHEN, Wei-Qian WANG, Xia-Li JIA, Chang-Hong WANG, Li YANG, Zheng-Tao WANG, Ai-Zhen XIONG. Firm evidence for the detoxification of senecionine-induced hepatotoxicity via *N*-glucuronidation in UGT1A4–humanized transgenic mice. *Food and Chemical Toxicology*. **2022**, 165, 113185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113185>
21. Johanna EBMEYER, Albert BRAEUNING, Hansruedi GLATT, Anja THESE, Stefanie HESSEL-PRAS, Alfonso LAMPEN. Human CYP3A4-mediated toxification of the pyrrolizidine alkaloid lasiocarpine. *Food and Chemical Toxicology*. **2019**, 130, 79–88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.019>
22. Ina GEBUREK, Lukas RUTZ, Lan GAO, Jan-Heiner KÜPPER, Anja THESE, Dieter SCHRENK. Metabolic Pattern of Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids in Liver Cells.

- Chemical Research in Toxicology*. **2021**, *34* (4), 1101–1113. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00507>
23. Jianqing RUAN, Mengbi YANG, Peter FU, Yang YE, Ge LIN. Metabolic Activation of Pyrrolizidine Alkaloids: Insights into the Structural and Enzymatic Basis. *Chemical Research in Toxicology*. **2014**, *27* (6), 1030–1039. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx500071q>
24. Xiaobo HE, Qingsu XIA, Peter P. FU. 7-Glutathione-pyrrole and 7-cysteine-pyrrole are potential carcinogenic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. **2017**, *35* (2), 69–83. DOI: <https://doi.org/10.1080/10590501.2017.1298358>
25. Claudia LUCKERT, Stefanie HESSEL, Dido LENZE, Alfonso LAMPEN. Disturbance of gene expression in primary human hepatocytes by hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids: A whole genome transcriptome analysis. *Toxicology in Vitro*. **2015**, *29* (7), 1669–1682. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.021>
26. Claudia NAUMANN, Thomas HARTMANN, Dietrich OBER. Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2002**, *99* (9), 6085–6090. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.082674499>
27. Thomas HARTMANN, Claudine THEURING, Ludger WITTE, Jacques M. PASTEELS. Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **2001**, *31* (11), 1041–1056. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00052-2)
28. Muluneh M. FASHE, Risto O. JUVONEN, Aleksanteri PETSALO, Juha RÄSÄNEN, Markku PASANEN. Species-Specific Differences in the in Vitro Metabolism of Lasiocarpine. *Chemical Research in Toxicology*. **2015**, *28* (10), 2034–2044. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00253>
29. Yisheng HE, Lin ZHU, Jiang MA, Ge LIN. Metabolism-mediated cytotoxicity and genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Archives of Toxicology*. **2021**, *95*, 1917–1942. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03060-w>

30. Thomas HARTMANN, Claudine THEURING, Jürgen SCHMIDT, Martine RAHIER, Jacques M. PASTEELS. Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of Insect Physiology*. **1999**, 45 (12), 1085–1095. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00093-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00093-1)
31. Yu-Qi HE, Li YANG, Hui-Xin LIU, Jiang-Wei ZHANG, Yong LIU, Alan FONG, Ai-Zhen XIONG, Yan-Liu LU, Ling YANG, Chang-Hong WANG, Zheng-Tao WANG. Glucuronidation, a New Metabolic Pathway for Pyrrolizidine Alkaloids. *Chemical Research in Toxicology*. **2010**, 23 (3), 6085–6090. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx900328f>
32. Rainer LINDIGKEIT, Andreas BILLER, Markus BUCH, Hans-Martin SCHIEBEL, Michael BOPPRÉ, Thomas HARTMANN. The two Faces of Pyrrolizidine Alkaloids: the Role of the Tertiary Amine and its *N*-Oxide in Chemical Defense of Insects with Acquired Plant Alkaloids. *European Journal of Biochemistry*. **1997**, 245 (3), 626–636. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00626.x>
33. Mirka MACEL. Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant–insect interactions. *Phytochemistry Reviews*. **2011**, 10, 75–82. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9181-1>
34. Aizhen XIONG, Fan YANG, Lianxiang FANG, Li YANG, Yuqi HE, Yvonne Yu-Jui WAN, Ying XU, Meng QI, Xiuli WANG, Kate YU, Karl Wah-Keung TSIM, Zhengtao WANG. Metabolomic and Genomic Evidence for Compromised Bile Acid Homeostasis by Senecionine, a Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloid. *Chemical Research in Toxicology*. **2014**, 27 (5), 775–786. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx400451q>
35. Stefanie HESSEL-PRAS, Albert BRAEUNING, Georgia GUENTHER, Alshaimaa ADAWY, Anne-Margarethe ENGE, Johanna EBMEYER, Colin J. HENDERSON, Jan G. HENGSTLER, Alfonso LAMPEN a Raymond REIF. The pyrrolizidine alkaloid senecionine induces CYP-dependent destruction of sinusoidal endothelial cells and cholestasis in mice. *Archives of Toxicology*. **2020**, 94, 219–229. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02582-8>
36. Wenju LIU, Xu LI, Bo ZHOU, Shoucai FANG, Wenzhe HO, Hui CHEN, Hao LIANG, Li YE, Jun TANG. Differential induction of apoptosis and autophagy by

- pyrrolizidine alkaloid clivorine in human hepatoma Huh-7.5 cells and its toxic implication. *PLOS ONE*. **2017**, 2 (6), e0179379. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179379>
37. Pieter B. PELSER, Helene DE VOS, Claudine THEURING, Till BEUERLE, Klaas VRIELING, Thomas HARTMANN. Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of *Senecio* section *Jacobaea* (*Asteraceae*). *Phytochemistry*. **2005**, 66 (11), 1285–1295. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.015>
38. Michał GLEŃSK, Marta K. DUDEK, Peter KINKADE, Evelyn C. S. SANTOS, Vitold B. GLINSKI, Daneel FERREIRA, Ewa SEWERYN, Sławomir KAŹMIERSKI, Joao B. CALIXTO a Jan A. GLINSKI. Isolation of Echimidine and Its C-7 Isomers from *Echium plantagineum* L. and Their Hepatotoxic Effect on Rat Hepatocytes. *Molecules*. **2022**, 27 (9), 2869. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27092869>
39. Y. CAO, S.M. COLEGATE, J.A. EDGAR. Persistence of echimidine, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid, from honey into mead. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2013**, 29 (2), 106-109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.11.005>
40. Yan-Hong LI, William Chi-Shing TAI, Imran KHAN, Cheng LU, Yao LU, Wing-Yan WONG, Wood-Yee CHAN, Wen-Luan Wendy HSIAO, Ge LIN. Toxicoproteomic assessment of liver responses to acute pyrrolizidine alkaloid intoxication in rats. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. **2018**, 36 (2), 65–83. DOI: <https://doi.org/10.1080/10590501.2018.1450186>
41. Xiaojing YANG, Weiwei LI, Ying SUN, Xiucui GUO, Wenlin HUANG, Ying PENG, Jiang ZHENG. Comparative Study of Hepatotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloids Retrorsine and Monocrotaline. *Chemical Research in Toxicology*. **2017**, 30 (2), 532–539. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00260>
42. Anja LEHMANN, Ina GEBUREK, Anja THESE, Stefanie HESSEL-PRAS, Jan G. HENGSTLER, Wiebke ALBRECHT, Hans MIELKE, Christine MÜLLER-GRAF, Xiaojing YANG, Charlotte KLOFT, Christoph HETHEY. PBTK modeling of the pyrrolizidine alkaloid retrorsine to predict liver toxicity in mouse and rat. *Archives of Toxicology*. **2023**, 97, 1319–1333. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03453-z>
43. Faizullah KAKAR, Zarif AKBARIAN, Toby LESLIE, Mir Lais MUSTAFA, John WATSON, Hans P. van EGMOND, Mohammad Fahim OMAR a Jawad MOFLEH.

- An Outbreak of Hepatic Veno-Occlusive Disease in Western Afghanistan Associated with Exposure to Wheat Flour Contaminated with Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of Toxicology*. **2010**, 2010, 7 pages. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/313280>
44. Li-Li JI, Xian-Guo ZHAO, Li CHEN, Mian ZHANG, Zheng-Tao WANG. Pyrrolizidine alkaloid clivorine inhibits human normal liver L-02 cells growth and activates p38 mitogen-activated protein kinase in L-02 cells. *Toxicon*. **2002**, 40 (12), 1685–1690. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00184-8)
45. Li-Li JI, Ying CHEN, Zheng-Tao WANG. The toxic effect of pyrrolizidine alkaloid clivorine on the human embryonic kidney 293 cells and its primary mechanism. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **2008**, 60 (1), 87–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.11.010>
46. Xiong AIZHEN, Yan Artemis LU, BI Cathy W.C., LAM Kelly Y.C., CHAN Gallant K.L., LAU Kitty K.M., DONG Tina T.X., Lin HUANGQUAN, Yang LI, Wang ZHENGTAO, TSIM Karl W.K. Clivorine, an otonecine pyrrolizidine alkaloid from *Ligularia* species, impairs neuronal differentiation via NGF-induced signaling pathway in cultured PC12 cells. *Phytomedicine*. **2016**, 23 (9), 931–938. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.06.006>
47. Bryan L. COPPLE, Patricia E. GANEY, Robert A. ROTH. Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. *Toxicology*. **2003**, 190 (3), 155–169. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00164-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00164-1)
48. Bowen GONG, Shiyu ZHANG, Xin WANG, Guangyun RAN, Xiaohong ZHANG, Jing XI, Zhenna GAO, Yuyang LEI, Jie PAN, Ying LIU, Yang LUAN, Xinyu ZHANG, Ying PENG, Weiwei LI, Jiang ZHENG. Inflammation Intensifies Monocrotaline-Induced Liver Injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2023**, 71 (7), 3433–3443. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07939>
49. Gessiane F. GERMANO, Augusto L. SOUTO, Wamberto A. M. DE ALMEIDA, Fátima D. FREIRE, Dayanne L. PORTO, Ana P. B. GOMES, Leandro S. FERREIRA, Fernando H. A. NOGUEIRA, Rita C. O. SEBASTIÃO, Raquel B. GIORDANI & Cícero F. S. ARAGÃO. A new approach for the thermal characterization of monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **2021**, 146, 2533–2542. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-021-10780-9>

50. Mohammed ISMAIL, Xi ZHANG, Reham TAHA, Muhanad ELHAFIZ, Qianwen ZHANG, Bashir A. YOUSEF, Xin HUANG, Zhenzhou JIANG, Luyong ZHANG, Lixin SUN. Expression profiles of lncRNAs and their possible regulatory role in monocrotaline-induced HSOS in rats. *Frontiers in Genetics*. **2023**, *14*, 1041266. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1041266>
51. Feifei LIN, Anni PAN, Yang YE, Jia LIU. Simultaneous determination of monocrotaline and its N-oxide metabolite in rat plasma using LC–MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. **2021**, *35* (12), e5207. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.5207>
52. Jianqing RUAN, Cangsong LIAO, Yang YE, Ge LIN. Lack of Metabolic Activation and Predominant Formation of an Excreted Metabolite of Nontoxic Platynecine-Type Pyrrolizidine Alkaloids. *Chemical Research in Toxicology*. **2014**, *27* (1), 7–16. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx4004159>
53. Yisheng HE, Yun LONG, Chunyuan ZHANG, Jiang MA, Changqiang KE, Chunping TANG, Yang YE, Ge LIN. Dietary alcohol exacerbates the hepatotoxicity induced by pyrrolizidine alkaloids: Hazard from food contamination. *Journal of Hazardous Materials*. **2022**, *424*, 127706. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127706>
54. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*. **2011**, *9* (11), 2406. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2406>
55. Zijng SONG, Yisheng HE, Jiang MA, Peter P. FU, Ge LIN. Pulmonary toxicity is a common phenomenon of toxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. **2020**, *38* (2), 124–140. DOI: <https://doi.org/10.1080/26896583.2020.1743608>
56. Florian KALTNER, Verena KUKULA, Christoph GOTTSCHALK. Screening of food supplements for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. **2020**, *15*, 237–243. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00003-020-01296-9>
57. Thomas HARTMANN. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*. **1999**, *207*, 483–495. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004250050508>

58. Ziqi WANG, Haolei HAN, Chen WANG, Qinqin ZHENG, Hongping CHEN, Xiangchun ZHANG, Ruyan HOU. Hepatotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloid Compound Intermedine: Comparison with Other Pyrrolizidine Alkaloids and Its Toxicological Mechanism. *Toxins*. **2021**, *13* (12), 849. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13120849>
59. Sarah F. AL-SUBAIE, Abdullah M. ALOWAIFEER and Maged E. MOHAMED. Pyrrolizidine Alkaloid Extraction and Analysis: Recent Updates. *Foods*. **2022**, *11* (23), 3873. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11233873>
60. Helle Katrine KNUTSEN, Jan ALEXANDER, Lars BARREGÅRD, Margherita BIGNAMI, Beat BRÜSCHWEILER, Sandra CECCATELLI, Bruce COTTRILL, Michael DINOVI, Lutz EDLER, Bettina GRASL-KRAUPP, Christer HOGSTRAND, Laurentius HOOGENBOOM, Carlo Stefano NEBBIA, Isabelle P. OSWALD, Annette PETERSEN, Martin ROSE, Alain-Claude ROUDOT, Tanja SCHWERDTLE, Christiane VLEMINCKX, Günter VOLLMER, Heather WALLACE, José Angel Gomez RUIZ, Marco BINAGLIA. Statement on the risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal*. **2017**, *15* (7), 4908. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4908>
61. Safinaz E. ABBAS, Fadi M. AWADALLAH, Nashwa A. IBRAHIM a Ahmed M. GOUDA. Novel substituted and fused pyrrolizine derivatives: Synthesis, anti-inflammatory and ulcerogenicity studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, *45* (2), 482–491. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.031>
62. Ramon Prata OLIVEIRA, Antonio Jacinto DEMUNER, Elson Santiago ALVARENGA, Luiz Claudio Almeida BARBOSA, Thiago de Melo SILVA. A novel alkaloid isolated from *Crotalaria paulina* and identified by NMR and DFT calculations. *Journal of Molecular Structure*. **2018**, *1152* (15), 337–343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.065>
63. Naoki ASANO, Robert J. NASH, Russell J. MOLYNEUX, George W.J FLEET. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2000**, *11* (8), 1645–1680. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)00113-0)

64. Xianqin WEI, Weibin RUAN a Klaas VRIELING. Current Knowledge and Perspectives of Pyrrolizidine Alkaloids in Pharmacological Applications: A Mini-Review. *Molecules*. **2021**, 26 (7), 1970. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26071970>
65. Na LI, Sheng-nan TAN, Jian CUI, Na GUO, Wei WANG, Yuan-gang ZU, Shuang JIN, Xian-xiu XU, Qun LIU a Yu-jie FU. PA-1, a novel synthesized pyrrolizidine alkaloid, inhibits the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane. *The Journal of Antibiotics*. **2014**, 67, 689–696. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2014.49>
66. Xianxiu XU, Yifei LI, Yu ZHANG, Lingjuan ZHANG, Ling PAN, Qun LIU. Direct Synthesis of 6-Azabicyclo[3.2.1]oct-6-en-2-ones and Pyrrolizidines from Divinyl Ketones and Observation of Remarkable Substituent Effects. *Advanced synthesis and catalysis*. **2011**, 353 (8), 1218–1222. DOI: <https://doi.org/10.1002/adsc.201000880>
67. Manjunatha Devagondanahalli HADAGALI, Lee Suan CHUA. The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. *European Food Research and Technology*. **2014**, 239, 1003–1014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2297-6>
68. Renren BAI, Chuansheng YAO, Zhichao ZHONG, Jiamin GE, Ziqiang BAI, Xiangyang YE, Tian XIE, Yuanyuan XIE. Discovery of natural anti-inflammatory alkaloids: Potential leads for the drug discovery for the treatment of inflammation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2021**, 213, 113165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113165>
69. Mohamed ABOELMAGD, Khaled ELOKELY, Mohamed A. ZAKI, Ataa SAID, Eman G. HAGGAG, Samir A. ROSS. Anti-inflammatory of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium digynum*. *Medicinal Chemistry Research*. **2018**, 27, 1066–1073. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2128-y>
70. Le Son HOANG, Manh Hung TRAN, Joo Sang LEE, Dao Cuong TO, Van Thu NGUYEN, Jeong Ah KIM, Jeong Hyung LEE, Mi Hee WOO, Byung Sun MIN. Anti-inflammatory Activity of Pyrrolizidine Alkaloids from the Leaves of *Madhuca pasquieri* (Dubard). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2015**, 63 (6), 481–484. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00855>
71. Hao-yi SUN, Ning MA, Teng PAN, Cheng-lin DU, Jing-Yong SUN. Punicagranine, a new pyrrolizidine alkaloid with anti-inflammatory activity from the peels of *Punica*

- granatum*. *Tetrahedron Letters*. **2019**, 60 (18), 1231–1233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.03.056>
72. Holger ULBRICH, Bernd FIEBICH, Gerd DANNHARDT. Cyclooxygenase-1/2 (COX-1/COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitors of the 6,7-diaryl-2,3-1H-dihydropyrrolizine type. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2002**, 37 (12), 953–959. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01418-6](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01418-6)
73. Aniruddha DATTA, Alka NARULA, K. C. BANSAL, P. S. SRIVASTAVA. Enhanced Alkaloid Production in Callus Cultures of *Heliotropium indicum* L and Regeneration of Plantlets. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. **2003**, 12, 139–142. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03263174>
74. Jeremy ROBERTSON, Kiri STEVENS. Pyrrolizidine alkaloids: occurrence, biology, and chemical synthesis. *Natural Product Reports*. **2017**, 34, 62–89. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5NP00076A>
75. Nikoletta JEDLINSZKI, Boglárka BALÁZS, Erzsébet CSÁNYI, Dezső CSUPOR. Penetration of lycopsamine from a comfrey ointment through human epidermis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **2017**, 83, 1–4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.015>
76. Kenny KUCHTA, Mathias SCHMIDT. Safety of medicinal comfrey cream preparations (*Symphytum officinale* s.l.): The pyrrolizidine alkaloid lycopsamine is poorly absorbed through human skin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **2020**, 118, 104784. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104784>
77. Jakob A. SHIMSHONI, Shimon BAREL, Patrick P. J. MULDER. Comparative Risk Assessment of Three Native *Heliotropium* Species in Israel. *Molecules*. **2021**, 26 (3), 689. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26030689>
78. Thomas KOPP, Mona ABDEL-TAWAB, Boris MIZAIKOFF. Extracting and Analyzing Pyrrolizidine Alkaloids in Medicinal Plants: A Review. *Toxins*. **2020**, 12 (5), 320. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12050320>
79. Monique DE NIJS, Patrick P. J. MULDER, Mirjam D. KLIJNSTRA, Frank DRIEHUIS, Ron L. A. P. HOOGENBOOM. Fate of pyrrolizidine alkaloids during processing of milk of cows treated with ragwort. *Food Additives & Contaminants*:

- Part A*, **2017**, *34* (12), 2212–2219. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1364432>
80. A. H. D. SOLOFOMALALA, C. F. RAJEMIARIMOELISOA, R. L. JUDICAEAL, H. R. RANDRIANARIVO, D. A. D. RAKOTO, V. L. JEANNODA, A. BOUMENDJEL. Pyrrolizidine-Derived Alkaloids: Highly Toxic Components in the Seeds of *Crotalaria cleomifolia* Used in Popular Beverages in Madagascar. *Molecules*. **2021**, *26* (11), 3464. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26113464>
81. Mary T. FLETCHER, Patricia Y. HAYES, Michael J. SOMERVILLE, James J. DE VOSS. *Crotalaria medicaginea* Associated with Horse Deaths in Northern Australia: New Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59* (21), 11888–11892. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf203147x>
82. P. T. HOOPER. Epizootic Cystitis in Horses. *Australian Veterinary Journal*. **1968**, *44* (1), 11–14. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1968.tb04902.x>
83. Mary T. FLETCHER, Ross A. MCKENZIE, Barry J. BLANEY, Keith G. REICHMANN. Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria* Taxa from Northern Australia: Risk to Grazing Livestock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, *57* (1), 311–319. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf8026099>
84. V.M.T. NOBRE, A.F.M. DANTAS, F. RIET-CORREA, J.M. BARBOSA FILHO, I.M. TABOSA, J.S. VASCONCELOS. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon*. **2005**, *45* (3), 347–352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.11.005>
85. Hesham R. EL-SEEDI, Noriko SATA, Kurt B. G. TORSSELL, Shigeru NISHIYAMA. New Labdene Diterpenes from *Eupatorium glutinosum*. *Journal of Natural Products*. **2002**, *65* (5), 728–729. DOI: <https://doi.org/10.1021/np010595r>
86. A. URZUA, M. CAROLI, L. VASQUEZ, L. MENDOZA, M. WILKENS, E. TOJO. Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **1998**, *62* (3), 251–254. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00068-3)
87. Anushika SIRINTHIPAPORN, Wannee JIRAUNGKOORSKUL. Wound Healing Property Review of Siam Weed, *Chromolaena odorata*. *Pharmacognosy Reviews*. **2017**, *11* (21), 35–38. DOI: [10.4103/phrev.phrev_53_16](https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_53_16)

88. AYYANAR M., IGNACIMUTHU S. Herbal medicines for wound healing among tribal people in Southern India: Ethnobotanical and Scientific evidences. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. **2009**, 2 (3), 29–42. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/43772085_Herbal_medicines_for_wound_healing_among_tribal_people_in_Southern_India_Ethnobotanical_and_Scientific_evidences
89. Ke ZAN, Xiaowen HU, Yaolei LI, Ying WANG, Hongyu JIN, Tiantian ZUO, Shuangcheng MA. Simultaneous determination of eight pyrrolizidine alkaloids in various parts of *Eupatorium lindleyanum* by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and risk assessments based on a real-life exposure scenario. *Journal of Separation Science*. **2021**, 44 (17), 3237–3247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.202100286>
90. Yan ZHANG, Fei-Fei YANG, Huan CHEN, Yao-Dong QI, Jian-Yong SI, Qing WU, Yong-Hong LIAO. Analysis of pyrrolizidine alkaloids in *Eupatorium fortunei* Turcz. and their in vitro neurotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. **2021**, 151, 112151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112151>
91. Peter P. FU, Qingsu XIA, Xiaobo HE, Shimon BAREL, Nir EDERY, Frederick A. BELAND, Jakob A. SHIMSHONI. Detection of Pyrrolizidine Alkaloid DNA Adducts in Livers of Cattle Poisoned with *Heliotropium europaeum*. *Chemical Research in Toxicology*. **2017**, 30 (3), 851–858. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00456>
92. Jakob Avi SHIMSHONI, Patrick P. J. MULDER, Arieli BOUZNACH, Nir EDERY, Israel PASVAL, Shimon BAREL, Mohammed Abd-El KHALIQ, Samuel PERL. *Heliotropium europaeum* Poisoning in Cattle and Analysis of Its Pyrrolizidine Alkaloid Profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2015**, 63 (5), 1664–1672. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf5052199>
93. Shuai HUANG, Xian-li ZHOU, Cui-juan WANG, You-song WANG, Feng XIAO, Lian-hai SHAN, Zhi-yun GUO, Jie WENG. Pyrrolizidine alkaloids from *Liparis nervosa* with inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW264.7 macrophages. *Phytochemistry*. **2013**, 93, 154–161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.03.009>

94. Lin CHEN, Shuai HUANG, Chun Ying LI, Feng GAO, Xian Li ZHOU. Pyrrolizidine alkaloids from *Liparis nervosa* with antitumor activity by modulation of autophagy and apoptosis. *Phytochemistry*. **2018**, *153*, 147–155. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.06.001>
95. Shuai HUANG, De-Xin ZHONG, Lian-Hai SHAN, Ye-Zi ZHENG, Zhi-Kuan ZHANG, Ya-Heng BU, Hong-Wen MA, Xian-Li ZHOU. Three new pyrrolizidine alkaloids derivatives from *Liparis nervosa*. *Chinese Chemical Letters*. **2016**, *27* (5), 757–760. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.01.003>
96. Dieter SCHRENK, Lan GAO, Ge LIN, Catherine MAHONY, Patrick P.J. MULDER, Ad PEIJNENBURG, Stefan PFUHLER, Ivonne M.C.M. RIETJENS, Lukas RUTZ, Barbara STEINHOF, Anja THESE. Pyrrolizidine alkaloids in food and phytomedicine: Occurrence, exposure, toxicity, mechanisms, and risk assessment - A review. *Food and Chemical Toxicology*. **2020**, *136*, 111107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111107>
97. Chuanhui MA, Yang LIU, Lin ZHU, Hong JI, Xun SONG, Hui GUO, Tao YI. Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: A critical review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*. **2018**, *119*, 50–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.037>
98. Caroline T. GRIFFIN, Martin DANAHER, Christopher T. ELLIOTT, D. Glenn KENNEDY, Ambrose FUREY. Detection of pyrrolizidine alkaloids in commercial honey using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2013**, *136* (3–4), 1577–1583. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.112>
99. Dirk SELMAR, Alzahraa RADWAN, Tahani HIJAZIN, Sara ABOUZEID, Mahdi YAHYAZADEH, Laura LEWERENZ, Maik KLEINWÄCHTER, Melanie NOWAK. Horizontal Natural Product Transfer: Intriguing Insights into a Newly Discovered Phenomenon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2019**, *67* (32), 8740–8745. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03619>
100. Maurizio BATTINO, Tamara Y. FORBES-HERNÁNDEZ, Massimiliano GASPARRINI, Sadia AFRIN, Danila CIANCIOSI, Jiaojiao ZHANG, Piera P. MANNA, Patricia REBOREDO-RODRÍGUEZ, Alfonso Varela LOPEZ, José L. QUILES, Bruno MEZZETTI, Stefano BOMPADRE, Jianbo XIAO, Francesca GIAMPIERI. Relevance of functional foods in the Mediterranean diet: the role of

- olive oil, berries and honey in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2019**, 59 (6), 893–920. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1526165>
101. Matteo A. LUCCHETTI, Gaetan GLAUSER, Verena KILCHENMANN, Arne DÜBECKE, Gudrun BECKH, Christophe PRAZ, Christina KAST. Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium vulgare* in Honey Originate Primarily from Floral Nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2016**, 64 (25), 5267–5273. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02320>
102. Marianna MARTINELLO, Camilla CRISTOFOLI, Albino GALLINA, Franco MUTINELLI. Easy and rapid method for the quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry: An evaluation in commercial honey. *Food Control*. **2014**, 37, 146–152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.037>
103. F.J. ORANTES-BERMEJO, J. Serra BONVEHÍ, A. GÓMEZ-PAJUELO, M. MEGÍAS, C. TORRES. Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in Spanish honey collected from purple viper's bugloss (*Echium* spp.). *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2013**, 30 (10), 1799–1806. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.817686>
104. Tingting WANG, Henrik Lauritz FRANDSEN, Natasha Roed CHRISTIANSSON, Sofie Elisabeth ROSENDAL, Mikael Pedersen, Jørn SMEDSGAARD. Pyrrolizidine alkaloids in honey: Quantification with and without standards. *Food Control*. **2019**, 98, 227–237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.033>
105. Hans REINHARD, Otmar ZOLLER. Pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal tea and iced tea beverages– survey and transfer rates. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2021**, 38 (11), 1914–1933. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1941302>
106. Hui CAO. Polysaccharides from Chinese tea: Recent advance on bioactivity and function. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2013**, 62, 76–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.033>
107. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2020/2040, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity pyrrolizidinových alkaloidů v některých potravinách. *Úřední věstník Evropské unie*. **2020**, L 420/1. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32020R2040&from=ES>

- 108.EFSA. Hodnocení dietární expozice pyrrolizidinovým alkaloidům v evropské populaci. *EFSA Journal*. **2016**, *14* (8), 4572. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4572>
- 109.Helmut WIEDENFELD, John EDGAR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochemistry Reviews*. **2011**, *10*, 137–151. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9174-0>
110. L.A.P. HOOGENBOOM, P.P.J. MULDER, M.J. ZEILMAKER, H.J. VAN DEN TOP, G.J. REMMELINK, E.F.A. BRANDON, M. KLIJNSTRA, G.A.L. MEIJER, R. SCHOTHORST, H.P. VAN EGMOND. Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2011**, *28* (3), 359–372. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.547521>
- 111.Patrick P.J. MULDER, Mirjam D. KLIJNSTRA, Roselinde M.A. GOSELINK, Ad M. VAN VUUREN, John W. CONE, Geert STOOPEN, Ron L.A.P. HOOGENBOOM. Transfer of pyrrolizidine alkaloids from ragwort, common groundsel and viper's bugloss to milk from dairy cows. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2020**, *37* (11), 1906–1921. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1798028>
- 112.Patrick P.J. MULDER, Patricia López SÁNCHEZ, Anja THESE, Angelika PREISS-WEIGERT, Massimo CASTELLARI. Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. *EFSA Supporting Publication*. **2015**, *12* (8), 859E. DOI: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2015.EN-859>
- 113.Gonzalo J. DIAZ, Leidy X. ALMEIDA, Dale R. GARDNER. Effects of dietary *Crotalaria pallida* seeds on the health and performance of laying hens and evaluation of residues in eggs. *Research in Veterinary Science*. **2014**, *97* (2), 297–303. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.06.011>
- 114.Patrick P. J. MULDER, Susannah L. DE WITTE, Geert M. STOOPEN, Jan VAN DER MEULEN, Piet G. VAN WIKSELAAR, Erik GRUYS, Maria J. GROOT, Ron L. A. P. HOOGENBOOM. Transfer of pyrrolizidine alkaloids from various herbs to eggs and meat in laying hens. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2016**, *33* (12), 1826–1839. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1241430>
- 115.Colin CREWS. Methods for Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids. *Natural Products*. **2013**, 1049–1068. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_186

116. Rosa PERESTRELO, Pedro SILVA, Priscilla PORTO-FIGUEIRA, Jorge A.M. PEREIRA, Catarina SILVA, Sonia MEDINA, José S. CÂMARA. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*. **2019**, *1070*, 1–28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>
117. Mozhdeh SARRAF, Adel BEIG-BABAEI, Sara NAJI-TABASI. Application of QuEChERS method for extraction of functional compounds. *SN Applied Sciences*. **2020**, *2*, 1858. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03639-5>
118. Lorena GONZÁLEZ-GÓMEZ, Sonia MORANTE-ZARCERO, Damián Pérez-QUINTANILLA, Isabel SIERRA. Occurrence and Chemistry of Tropane Alkaloids in Foods, with a Focus on Sample Analysis Methods: A Review on Recent Trends and Technological Advances. *Foods*. **2022**, *11* (3), 407. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11030407>
119. Evangelia TSIOKANOS, Nikolaos TSAFANTAKIS, Hélène OBÉ, Till BEUERLE, Mathieu LETI, Nikolas FOKIALAKIS, Antonio GRONDIN. Profiling of pyrrolizidine alkaloids using a retronecine-based untargeted metabolomics approach coupled to the quantitation of the retronecine-core in medicinal plants using UHPLC-QTOF. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2023**, *224*, 115171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115171>
120. Angela TARTAGLIA, Marcello LOCATELLI, Abuzar KABIR, Kenneth G. FURTON, Daniela MACEROLA, Elena SPERANDIO, Silvia PICCOLANTONIO, Halil I. ULUSOY, Fabio MARONI, Pantaleone BRUNI, Fausto CROCE, Victoria F. SAMANIDOU. Comparison between Exhaustive and Equilibrium Extraction Using Different SPE Sorbents and Sol-Gel Carbowax 20M Coated FPSE Media. *Molecules*. **2019**, *24* (3), 382. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24030382>
121. Emmanuel LETSYO. High-performance counter-current chromatography purification and *off-line* mass spectrometry monitoring and identification of pyrrolizidine alkaloid markers of tropical Ghanaian honey. *Journal of Separation Science*. **2022**, *45* (4), 960–967. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202100718>
122. Colin CREWS, Franz BERTHILLER, Rudi KRŠKA. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2010**, *396*, 327–338. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3092-2>

123. Yilin CHEN, Linnan LI, Fen XIONG, Yanqiao XIE, Aizhen XIONG, Zhengtao WANG, Li YANG. Rapid identification and determination of pyrrolizidine alkaloids in herbal and food samples via direct analysis in real-time mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2021**, 334, 127472. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127472>
124. Tianyang GUO, Wei YONG, Yong JIN, Liya ZHANG, Jiahui LIU, Sai WANG, Qilong CHEN, Yiyang DONG, Haijia SU, Tianwei TAN. Applications of DART-MS for food quality and safety assurance in food supply chain. *Mass Spectrometry Reviews*. **2017**, 36 (2), 161–187. DOI: <https://doi.org/10.1002/mas.21466>
125. J. Brent FRIESEN, James B. MCALPINE, Shao-Nong CHEN, Guido F. PAULI. Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. *Journal of Natural Products*. **2015**, 78 (7), 1765–1796. DOI: <https://doi.org/10.1021/np501065h>
126. An-Jing LU, Yan-Liu LU, Dao-Peng TAN, Lin QIN, Hua LING, Chang-Hong WANG, Yu-Qi HE. Identification of Pyrrolizidine Alkaloids in *Senecio* Plants by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. **2021**, 2021, 1957863. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/1957863>
127. Feng LONG, Jie JI, Xin WANG, Lili WANG, Ting CHEN. LC–MS/MS method for determination of seneciphylline and its metabolite, seneciphylline *N*-oxide in rat plasma, and its application to a rat pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. **2021**, 35 (9), e5145. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.5145>
128. Elena STEFOVA, Marinela CVETANOSKA, Jane BOGDANOV, Vlado MATEVSKI, Jasmina Petreska STANOJEVA. Assessment of Distribution and Diversity of Pyrrolizidine Alkaloids in the Most Prevalent Boraginaceae Species in Macedonia. *Chemistry and Biodiversity*. **2022**, 19 (7), e202200066. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200066>
129. Bharathi AVULA, Satyanarayanaraju SAGI, Yan-Hong WANG, Jerry ZWEIGENBAUM, Mei WANG, Ikhlas A. KHAN. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and *N*-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2015**, 178, 136–148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.053>
130. Ting CHENG, Weiwei LI, Xiaojing YANG, Huali WANG, Fan ZHANG, Na LI, Ge LIN, Jiang ZHENG. Antibody-based detection of lysine modification of hepatic

- protein in mice treated with retrorsine. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. **2020**, 38 (4), 315–328. DOI: <https://doi.org/10.1080/26896583.2020.1832411>
131. Stephen T. LEE, Thomas K. SCHOCH, Bryan L. STEGELMEIER, Dale R. GARDNER, Khin A. THAN, Russell J. MOLYNEUX. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Hepatotoxic Alkaloids Riddelliine and Riddelliine *N*-Oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49 (8), 4144–4151. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf010042m>
132. Anja THESE, Dorina BODI, Stefan RONCZKA, Monika LAHRSEN-WIEDERHOLT & Angelika PREISS-WEIGERT. Structural screening by multiple reaction monitoring as a new approach for tandem mass spectrometry: presented for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2013**, 405, 9375–9383. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7365-4>
133. Clara L. FEIDER, Anna KRIEGER, Rachel J. DE HOOG, Livia S. EBERLIN. Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications. *Analytical Chemistry*. **2019**, 91 (7), 4266–4290. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00807>
134. H. BIRECKA, J.L. CATALFAMO, R.N. EISEN. A sensitive method for detection and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*. **1981**, 20 (2), 343–344. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85124-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85124-2)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AK	aminokyselina
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
BfR	Spolkový úřad pro hodnocení rizik (Das Bundesinstitut für Risikobewertung)
CCC	protiproudá chromatografie
CCCS	odstředivá protiproudá separace
CE	kapilární elektroforéza
CPC	odstředivá dělicí chromatografie
CSS	protiproudá separace
DART	přímá analýza v reálném čase
DCCC	kapková protiproudová chromatografie
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
GSH	glutathion
HPCCC	vysokoúčinná proudová chromatografie
HPLC	vysoceúčinná kapalinová chromatografie
HSCCC	vysokorychlostní protiproudová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LD	smrtná dávka
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MEKC	elektrokinetická chromatografie
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRM	vícenásobné reakční monitorování

MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PA	pyrrolizidinové alkaloidy
PANO	<i>N</i> -oxidy pyrrolizidinových alkaloidů
Q-TOF	hybridní hmotnostní analyzátor na bázi kvadrupólu a analyzátoru doby letu
QuEChERS	rychlý, jednoduchý, levný, účinný, robustní a bezpečný
SPE	extrakce na pevné fázi
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHT	ošetření velmi vysokou teplotou
UV	ultrafialové

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura PA a jeho různé formy; R ₁ a R ₂ odpovídají různým necinovým kyselinám (upraveno dle citace [12]).	10
Obrázek 2 Strukturní vzorce PA dle struktury necinové báze	11
Obrázek 3 Příklady PA s monoesterovou, otevřenou diesterovou a cyklickou diesterovou strukturou.	12
Obrázek 4 Biosyntéza PA (upraveno dle citace [19]).	13
Obrázek 5 Hlavní metabolická dráha PA (upraveno dle citace [14]).	14
Obrázek 6 Jaterní metabolická aktivace PA retronecinového a otonecinového typu (upraveno dle citace [23]).	15
Obrázek 7 N-oxidace (způsob detoxikace PA), (upraveno dle citace [32]).	16
Obrázek 8 Strukturní vzorec senecioninu.	18
Obrázek 9 Echimidin a jeho izomery (upraveno dle citace [38]).	19
Obrázek 10 Strukturní vzorec retrorsinu.	20
Obrázek 11 Laziokarpin, dehyrolaziokarpin a laziokarpin N-oxid.	21
Obrázek 12 Klivorin, monokrotalin, platyfylin.	22
Obrázek 13 Struktura vybraných 1,2-nenasycených necinů (upraveno dle citace [2]).	23
Obrázek 14 Klasifikace poločasů rozpadu (min) lasiokarpinu, senecioninu, intermedinu a senkirkinu v koncentraci 0,5 μM pro osm zkoumaných druhů (upraveno dle citace [10]).	26
Obrázek 15 Strukturní vzorec 6-azabicyklo[3.2.1]okt-6-en-2-onu (upraveno dle citace [66]).	28
Obrázek 16 PA izolované z <i>Punica granatum</i> a <i>Madhuca pasquieri</i> .	29
Obrázek 17 Pyrrolizinové sloučeniny s protizánětlivou aktivitou (upraveno dle citace [61]).	30
Obrázek 18 Indicin N-oxid, lykopsamin a intermedin.	32
Obrázek 19 PA odvozeny od senecioninu vyskytující se v rostlinách rodu <i>Senecio</i> .	34
Obrázek 20 Usaramin.	35
Obrázek 21 Strukturní vzorce derivátů nervosinu I–VI.	37
Obrázek 22 Strukturní vzorce derivátů nervosinu VII–IX.	37
Obrázek 23 Strukturní vzorce nervosinu X–XV, nervosin VII N-oxidu a chloridu-(N-chlormethyl nervosinu VII).	38
Obrázek 24 Příklady rostlin s obsahem PA; a) <i>Senecio jacobaea</i> , b) <i>Echium plantagenium</i> , c) <i>Crotalaria pallida</i> , d) <i>Heliotropium arborescens</i> , e) <i>Eupatorium lindleyanum</i> , f) <i>Liparis nervosa</i> .	39
Obrázek 25 Celkové koncentrace PA v mléce dojníc (upraveno dle citace [111]).	44
Obrázek 26 Strukturní vzorce otoseninu, senkirkinu a jakolinu.	44

Obrázek 27 a) Kromedin, b) $1\beta,2\beta$ -epoxy- 7β -hydroxy- 1α -methoxymethyl- 8α -pyrrolizidin (upraveno dle citace [81]).	53
Obrázek 28 Riddelliin a riddelliin <i>N</i> -oxid.	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Skupiny PA dle struktury necinové báze.	11
Tabulka 2 Rozdíly mezi <i>N</i> -oxidem a terciálním alkaloidem. [32]	17
Tabulka 3 Nařízení evropské komise pro maximální limity pyrrolizidinových alkaloidů v některých potravinách (upraveno dle citace [107]).	46