Bee pollen pyrrolizidine alkaloids detection by NIR spectroscopy

I. Lanza1\*, L.J. Inacio2, R. Merlanti2, B. Contiero1, L. Lucatello2, V. Bisutti1, L. Serva1, M. Mirisola1, S. Tenti1, S. Segato1, F. Capolongo2

1 Dept. of Animal Medicine, Production and Health, University of Padova, V.le dell’Università, 16, 35020, Legnaro (PD), Italy

2 Dept. of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, V.le dell’Università, 16, 35020, Legnaro (PD), Italy  
\*Corresponding author: ilaria.lanza@phd.unipd.it

Bee pollen is a natural product rich in many nutritional compounds, but it could be contaminated with pyrrolizidine alkaloids (PAs) that can cause acute and chronic toxicity in humans. These toxins has been detected by time-consuming and expensive analytical chemistry techniques. Therefore, NIRS could be used as an alternative for the detection of PAs contamination. For this purpose, NIR spectral data were collected in 60 dehydrated ground bee pollen samples, by using a Foss DS2500 scanning monochromator (Foss NIR-System, Hillerød, DK) and a portable NIR system (PoliSPECNIR, ITPhotonics, Breganze, IT) and PAs were analyzed by LC-MS/MS. Based on EFSA suggestions, samples were grouped as PAs amount (µg kg-1 bee pollen): absence (N-class), < 84 (L-class), > 84 (H-class). For both spectrometers, a canonical discriminant analysis (CDA) was carried out following a feature selection of the significant NIR spectral variables based on ANOVA procedure. The D2-Mahalanobis sorted by the CDA were used to build a confusion matrix to test the reliability of the models. To determine the confusion matrix, each sample was reassigned to a PA-class according to the shortest D2-Mahalanobis distance; and the discriminative performance was evaluated by using the Matthews correlation coefficient (MCC). The CDA showed very similar high discriminative capacity (Wilks’λ < 0.22; p < 0.001) for both NIR systems, expecially in the identification of samples of the N-class (MCC = 0.78) even if 14.3% of samples were recognized as a false negative. A lower discriminant performance was observed for L- and H-class with a lower value of MCC for the portable compared to the Foss system (0.58 vs. 0.70). Moreover, 7.1% of H-samples were misclassified as N-class both in Foss and PoliSPECNIR. Findings suggest that the absence (N-class) of PAs could be reliable detected by NIR spectroscopy but discriminative models should be implemented analyzing additional contaminated bee pollens.

**Keywords:** Bee pollen, pyrrolizidine alkaloids (PAs), NIR spectroscopy, canonical discriminant analysis

**Acknowledgements:** This researchwas financially supported by Padova University (Project CPTA158894/15).

Rilevo di alcaloidi pirrolizidinici in polline d’api mediante spettroscopia NIR

I. Lanza1\*, L.J. Inacio2, R. Merlanti2, B. Contiero1, L. Lucatello2, V. Bisutti1, L. Serva1, M. Mirisola1, S. Tenti1, S. Segato1, F. Capolongo2

1 Dip. di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, V.le dell’Università, 16, 35020, Legnaro (PD), Italia

2 Dip. di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università di Padova, V.le dell’Università, 16, 35020, Legnaro (PD), Italia  
\*Autore referente: ilaria.lanza@phd.unipd.it

Il polline d'api è ricco in composti nutrizionali ma può contenere alcaloidi pirrolizidinici (AP), tossine responsabili di tossicità acuta e cronica nell'uomo. Tali tossine sono analizzate con dispendiose tecniche analitiche chimiche. In proposito, il NIRS potrebbe essere una alternativa per indentificare polline d'api contaminato da AP. Allo scopo, i dati spettrali sono stati raccolti in 60 campioni disidratati e macinati con un monocromatore Foss DS2500 (Foss NIR-System, Hillerød, DK) e un sistema portatile NIR (poliSPECNIR, ITPhotonics, Breganze, IT) e gli AP analizzati con una LC-MS/MS. Da indicazioni EFSA, i campioni sono stati raggruppati (µg kg-1 di PA in polline d'api) per: assenza (classe N), < 84 (classe L), > 84 (classe H). Per testare l'affidabilità degli strumenti NIR, previa selezione delle variabili spettrali significative (ANOVA), si è eseguita una *canonical discriminant analysis* (CDA), le cui D2-Mahalanobis distanze sono state usate per il calcolo delle matrici di confusione. Per la definizione delle stesse, la riassegnazione dei campioni entro gruppo AP è avvenuta in base al criterio di minimizzazione D2-Mahalanobis e la capacità discriminante è stata misurata in base ai Matthews correlation coefficient (MCC). Le CDA hanno evidenziato simili rilevanti capacità discriminanti (Wilks’λ < 0.22; p < 0.001) per entrambi i sistemi NIR soprattutto nell'identificare i campioni della classe N (MCC = 0.78), sebbene il 14.3% dei campioni siano risultati falsi negativi. I livelli di discriminazione per le classi L e H sono risultati inferiori, evidenziando minori valori di MCC per il sistema portatile rispetto al Foss (0.58 *vs* 0.70). Per entrambi i sistemi NIR, il 7.1% dei campioni H è confuso in classe N. In sintesi, l'assenza (N) di AP potrebbe essere rilevata dalla spettroscopia NIR, sebbene i modelli discriminanti debbano essere potenziati con ulteriori analisi di campioni contaminati.

**Parole chiave**: polline d'api, alcaloidi pirrolizidinici (PA), spettroscopia NIR, *canonical discriminant analysis*

**Ringraziamenti**:la ricerca è stata finanziata dall'Università degli Studi di Padova (Progetto CPTA158894/15).