

# Erweiterung der Mykotoxinanalytik um Zearalenon und um ausgewählte Zearalenon-Metaboliten in Kakao und Kakaoerzeugnissen (Projektbericht 2024)

Projektverantwortlicher: Dr. Alexander Maximilian Voigt

Projektzeitraum: 07. Mai 2024 – 31. Dezember 2024

Technische Durchführung: Tobias Petzold, Daniela Wallendszus, Sabine Kobus, Marcel von Guretzky-Cornitz

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rheinland AöR, Winterstraße 19, 50354 Hürth

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projektes wurde die LC-MS/MS-Multimethode zur Bestimmung von Mykotoxinen in Lebensmitteln um Zearalenon und dessen Metabolite ( $\alpha$ -Zearalenol,  $\beta$ -Zearalenol,  $\alpha$ -Zearalanol,  $\beta$ -Zearalanol, Zearalenon-14-Sulfat und Zearalenon-o-14- $\beta$ -Glucosid) in Schokolade, Kakao und Kakaoerzeugnissen erweitert.

Aufgrund der komplexen Matrix von Kakao und Schokolade sollte eine Aufreinigung der Proben in Verbindung mit einer selektiven Anreicherung der Zielanalyten mittels Immunaффinitätschromatographie etabliert werden. Dabei wurden im Rahmen der Methodenentwicklung eine mangelnde Selektivität der Antikörper für Zearalenon-Konjugate, nicht vollständig kompensierbare Aufarbeitungsverluste und Umlagerungen zwischen den Stereoisomeren sowie starke Matrixeffekte während der Ionisation (*Ion Enhancement*) festgestellt. Daher wurde stattdessen ein *Dilute-and-Shoot*-Ansatz nach QuEChERS-Aufarbeitung in der Methodenvalidierung und bei der Messung der Projektproben angewendet.

Die so erweiterte LC-MS/MS-Methode ermöglicht die Messung von Zearalenon und ausgewählten Zearalenon-Metaboliten zwischen 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  und 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Mit isotoπenmarkierten internen Standards ( $\alpha$ -Zearalenol-D<sub>4</sub>,  $\beta$ -Zearalenol-D<sub>4</sub> und <sup>13</sup>C<sub>18</sub>-Zearalenon) konnten gute Wiederfindungsraten für Zearalenon (94,0 %  $\pm$  9,9 %) und zufriedenstellende Wiederfindungsraten für die untersuchten Metabolite (80,4 %  $\pm$  5,1 % bis 124,9 %  $\pm$  8,6 %) erzielt werden.

In allen untersuchten 75 Schokoladenproben (Nuss-, Vollmilch- und Zartbitterschokolade) und 25 Kakaoproben wurden Zearalenon-Gehalte oberhalb von 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nachgewiesen. In 98 von 100 untersuchten Proben lag der Zearalenon-Gehalt oberhalb der Bestimmungsgrenze von 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Im Median wurden 10,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Zearalenon in den untersuchten Schokoladen und 13,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in den untersuchten Kakao-Erzeugnissen gefunden. Der höchste Zearalenon-Gehalt wurde in einem Bio-Backkakao nachgewiesen (93  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Der höchste Gehalt in den untersuchten Schokoladen wurde in einer Zartbitterschokolade mit 50 % deklariertem Kakaoanteil bestimmt (54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Ein klarer Trend zwischen Vollmilch-, Nuss- und Zartbitterschokolade war nicht zu verzeichnen.

In den untersuchten Proben konnten keine Zearalenon-Metabolite nachgewiesen werden (LOD: 2,5 µg/kg; LOQ: 5,0 µg/kg).

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Projektarbeit sollten Schokoladen- und Kakaoproben - neben dem rechtlich reglementierten Ochratoxin A - auch auf Zearalenon untersucht werden, um die vorhandene Datengrundlage weiter auszubauen und Kakao und Schokolade als weitere Eintragsquelle bei der Expositionsbeurteilung der Bevölkerung mit Zearalenon mitberücksichtigen zu können.

Des Weiteren ist auffällig, dass in Kakao und Schokolade - im Vergleich zu den rechtlich reglementierten Lebensmitteln auf Getreidebasis - deutlich höhere Gehalte und deutlich höhere Nachweisquoten für Zearalenon festgestellt wurden (2024: 3,6 % aller untersuchten Getreideproben waren Zearalenon-positiv, n = 275; max. Gehalt 28,7 µg/kg).

Generell wird empfohlen, die in diesem Projekt nachgewiesenen Gehalte toxikologisch bewerten zu lassen, da es aktuell keine rechtlichen Höchstgehalte für Zearalenon in Kakao und / oder Schokolade gibt. Hierbei sollten insbesondere Kinder als Vielverzehrer und vulnerable Verbrauchergruppe stärker berücksichtigt werden, da ein erhöhter Beitrag zur tolerierbaren täglichen Aufnahmemenge an Zearalenon anzunehmen ist.

Der Gehalt an Phase I und Phase II Metaboliten scheint, entgegen der Literatur für andere Lebensmittelmatrices, in Kakao und Schokolade weniger von Relevanz zu sein.

## 1. Einleitung

Seit der Erweiterung der LC-MS/MS-Methode um die Matrices Schokolade sowie Kakao und Kakaoerzeugnisse im Jahr 2021 zeigten Routineuntersuchungen im CVUA Rheinland vereinzelt auffällig hohe Gehalte an Ochratoxin A (OTA) sowie Spuren an Aflatoxinen in Schokoladen sowie in Kakao und Kakaoerzeugnissen.

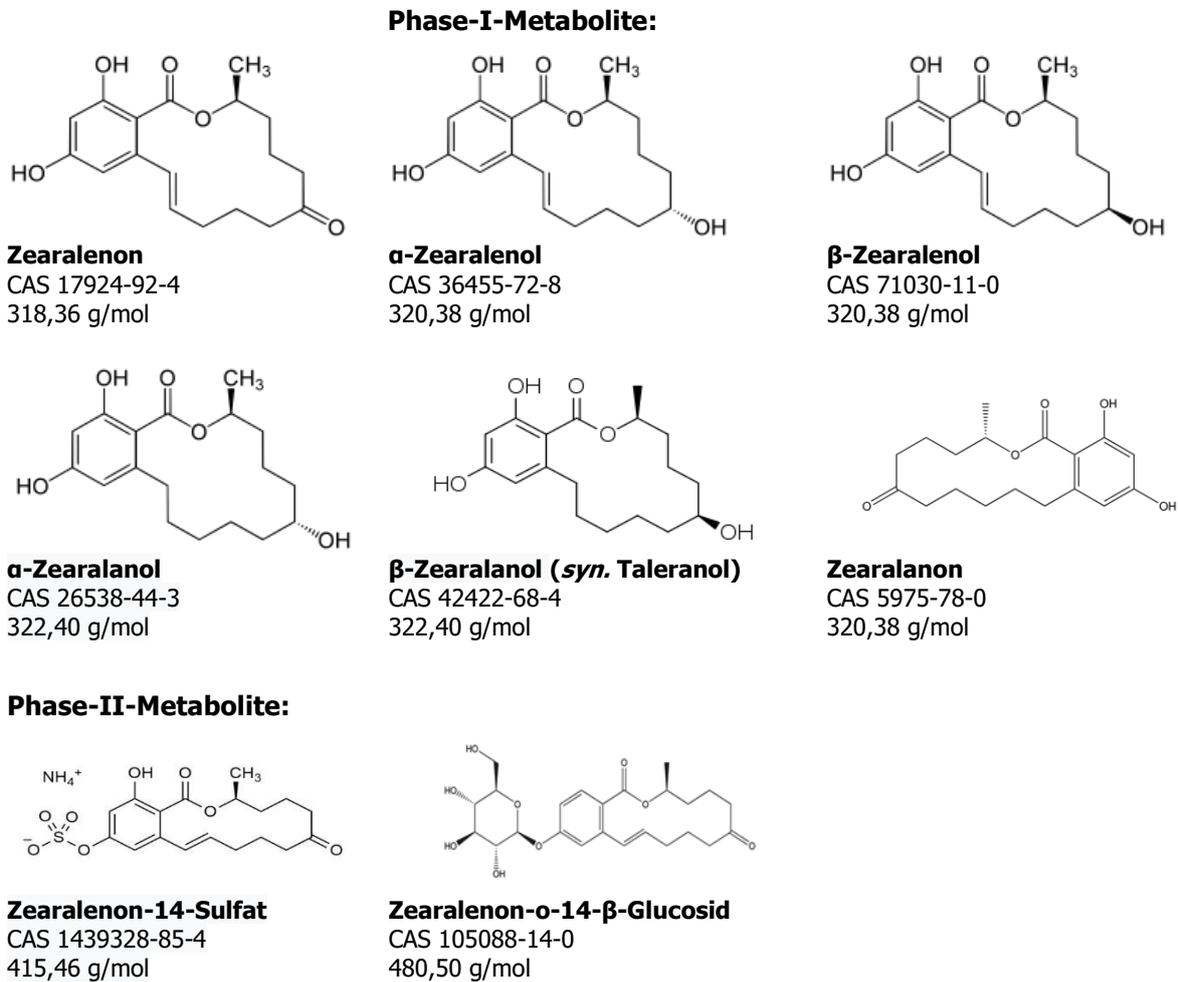
Ferner deuteten die Untersuchungsergebnisse auf ein mögliches Vorhandensein von Zearalenon (ZON) in Schokolade beziehungsweise Kakao hin. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse einer aktuellen brasilianischen Studie, die das Vorhandensein von Zearalenon in brasilianischen Kakaobohnen (36 µg/kg – 84 µg/kg) nachwies, bekräftigt. [1]

Daher soll zur Erweiterung des untersuchten Mykotoxin-Spektrums in Schokoladen sowie Kakao und –erzeugnissen ZON in die vorhandene Multimethode implementiert werden.

Vor diesem Hintergrund ist zu berücksichtigen, dass die aktuelle Tandem-MS-Methode lediglich die valide Detektion von ZON nach QuEChERS-Aufarbeitung in Getreide und Getreideerzeugnissen erlaubt.

Für die Untersuchung von öl- und farbstoffreichen Matrices wie zum Beispiel Gewürzen, Kaffee oder Kakao mit dem Untersuchungsziel Mykotoxine wird nach der QuEChERS-Extraktion eine Aufarbeitung mit Aflatoxin- beziehungsweise OTA-spezifischen Immunoaffinitätssäulen (engl. *immunoaffinity column*, IAC) benötigt. Aufgrund der mangelnden ZON-Spezifität der Antikörper der aktuell eingesetzten IAC müssen neben der Anpassung der LC-MS/MS-Methode neue IAC mit ZON-Spezifität getestet und validiert werden.

Chemisch betrachtet gehört ZON, welches von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium ssp.* gebildet wird, zur Gruppe der makrozyklischen Resorcyllsäurelactone (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1** Chemische Strukturen der Zielanalyten Zearalenon sowie ausgewählter Phase-I- und Phase-II-Metaboliten.

Im Allgemeinen sind bei der toxikologischen Bewertung von zum Beispiel Fusarientoxinen, wie Deoxynivalenol, T-2- und HT-2-Toxin oder Nivalenol auch sogenannte maskierte Formen zu berücksichtigen. [2] Hierbei handelt es sich um Metabolite der befallenen Pflanze oder von zur Lebensmittelgewinnung dienenden Tieren.

Am CVUA Rheinland werden bis dato Getreide und –erzeugnisse auf den mengenmäßig dominierenden Deoxynivalenol-Metabolit, Deoxynivalenol-3-Glykosid sowie die Minor-Metaboliten 3- und 15-Acetyldeoxynivalenol projektweise untersucht.

Im Rahmen des vorliegenden Projektes waren daher neben ZON zudem ausgewählte ZON-Phase I- und Phase-II-Metabolite von Interesse. Zum einen konnte bereits gezeigt werden, dass Phase-II-Metabolite, zum Beispiel Zearalenon-14-Sulfat, mengenmäßig häufiger in Weizenmahlprodukten vorkommen können als ZON (Faktor 2 bis 4). [3] Auch Zearalenon-14-o-Glykosid konnte bereits in Lebensmitteln wie zum Beispiel Mais nachgewiesen werden. [2; 3] Beim Verzehr solcher Konjugate ist durch Hydrolyse im Verdauungstrakt die Freisetzung von freiem ZON denkbar. Die Nichtberücksichtigung von Metaboliten kann so zu einer Unterschätzung der ZON-Exposition über die Nahrungskette führen. [4]

Neben der quantitativen Bedeutung der ZON-Metabolite konnte für die Phase-I-Metaboliten zudem gezeigt werden, dass insbesondere die  $\alpha$ -Epimere der Resorcylsäurelactone ( $\alpha$ -Zearalenol und  $\alpha$ -Zearalanol) die stärksten östrogenen Eigenschaften besitzen und daher bei einer toxikologischen Bewertung mitberücksichtigt werden sollten. [5]

Laut Schätzungen liegt ZON in Lebensmitteln und Futtermitteln bis zu 90 % metabolisiert vor. [2] Die Relevanz von ZON-Metaboliten für den Verbraucher zeigen zudem Untersuchungsergebnisse einer Humanstudie aus Valencia (Spanien) in der in nahezu jeder zweiten Urin-Probe ZON (40 %) und  $\alpha$ -Zearalenol (43 %) nachgewiesen wurde. Die Urin-Konzentrationen an ZON und dessen untersuchten Metaboliten lagen im Median bei circa 6,70 ng/mL (ZON), 12,43 ng/mL (Zearalenon-14-Glucosid), 27,44 ng/mL ( $\alpha$ -Zearalenol) beziehungsweise 12,84 ng/mL ( $\alpha$ -Zearalenol-14-Glucosid). [6]

Trotz fehlender Höchstgehalte für die Phase-I- und Phase-II-Metaboliten erscheint die Untersuchung im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes sinnvoll, da das CONTAM Panel der EU 2011 einen *tolerable daily intake* (TDI) von 0,25  $\mu$ g/kg Körpergewicht und Tag für ZON veröffentlichte und empfiehlt, bei der Bewertung von Lebensmitteln ebenfalls die ZON-Metabolite mit zu berücksichtigen. [7]

In der vorliegenden Arbeit lag der erste Fokus auf fermentierten Lebensmitteln. Im Rahmen der Schwerpunktbildung in NRW sind dies für das CVUA Rheinland allen voran Kakao und Kaffee, da in der Literatur nur wenig zu Gehalten an ZON und dessen Metaboliten beschrieben ist. Insbesondere Kakao und Kakaoerzeugnissen sind von Interesse, da ungünstige klimatische Bedingungen und Hygienekonzepte bei dem Anbau, der Ernte, der Verarbeitung und Lagerung von Kakaobohnen Risikofaktoren für einen erhöhten Schimmelpilzbefall darstellen. [8]

Vor diesem Hintergrund soll die LC-MS/MS-Multimethode für die Matrices Kakao und Kakaoerzeugnisse um ZON und die ausgewählten Metabolite erweitert werden, wobei das Ziel ist, mit einer parallelen Aufarbeitung und der bereits eingesetzten LC-MS/MS-Methode alle Zielverbindungen möglichst zeiteffizient und kostengünstig zu messen.

## 2. Methodik

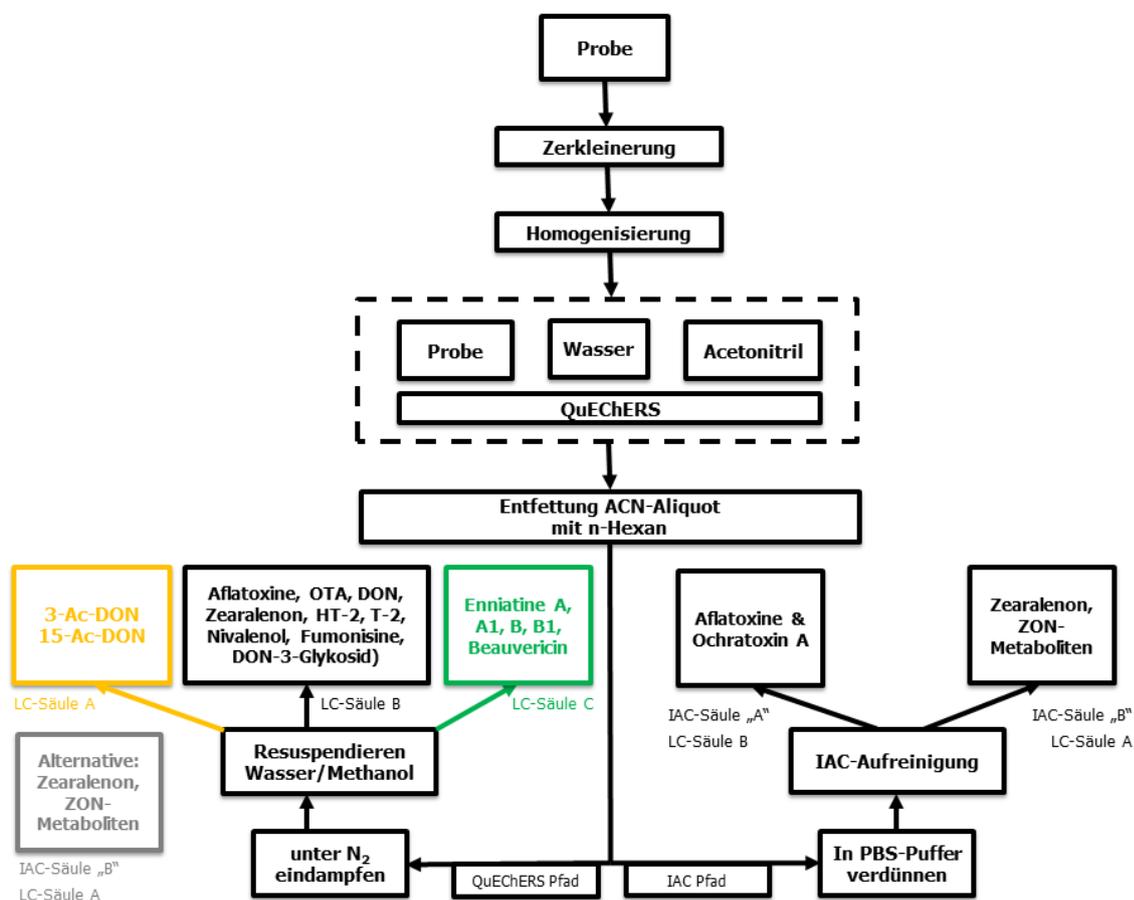
Die zu untersuchenden Schokoladen-Proben wurden entsprechend der Vorgaben der amtlichen Untersuchungsmethode L 00.00-111/1 (2008-12) „Untersuchung von Lebensmitteln - Probenvorbereitungsverfahren zur Bereitstellung der amtlichen Probe, Gegen- und Schiedsprobe für die Bestimmung des Mykotoxingehaltes in Lebensmitteln, Teil 1: Verfahren zur Nasshomogenisierung“ in einem Verhältnis Probe zu Wasser von 1 : 1 zerkleinert und homogenisiert.

Kakaopulver und kakaohaltige Getränkepulver wurden entsprechend der Vorgaben der amtlichen Untersuchungsmethode L 00.00-111/2 (2022-04) „Untersuchung von Lebensmitteln – Probenvorbereitungsverfahren zur Bereitstellung der Parallelproben für Vollzugs-, Handels- und Referenzzwecke für die Bestimmung des Mykotoxingehaltes in Lebensmitteln, Teil 2: Verfahren zur Zerkleinerung und Homogenisierung ohne Wasserzusatz“ homogenisiert.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgt in Anlehnung an die Prüfvorschrift P5221\_11\_014 „Multimethode – Bestimmung von Mykotoxinen in Lebensmitteln mittels HPLC-MS/MS“ des CVUA Rheinland (vgl. Abbildung 2).

Zur Kompensation von Aufarbeitungsverlusten und von etwaigen Matrixeffekten während der Ionisation werden isotope markierte Standards (Zearalenon- $^{13}\text{C}_{18}$  (ZON- $^{13}\text{C}_{18}$ ),  $\alpha$ -Zearalenol- $\text{D}_4$  ( $\alpha$ -ZOL- $\text{D}_4$ ) und  $\beta$ -Zearalenol- $\text{D}_4$  ( $\beta$ -ZOL- $\text{D}_4$ )) unmittelbar auf die Einwaage dotiert. Im Anschluss erfolgt eine Extraktion in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril unter Zuhilfenahme von QuEChERS-Salzen.

Ein Aliquot der entfetteten Acetonitril-Phase wird mit phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt und abschließend über eine IAC selektiv aufgereinigt beziehungsweise direkt eingedampft, resuspendiert und injiziert (QuEChERS-*Dilute-and-Shoot*-Ansatz).



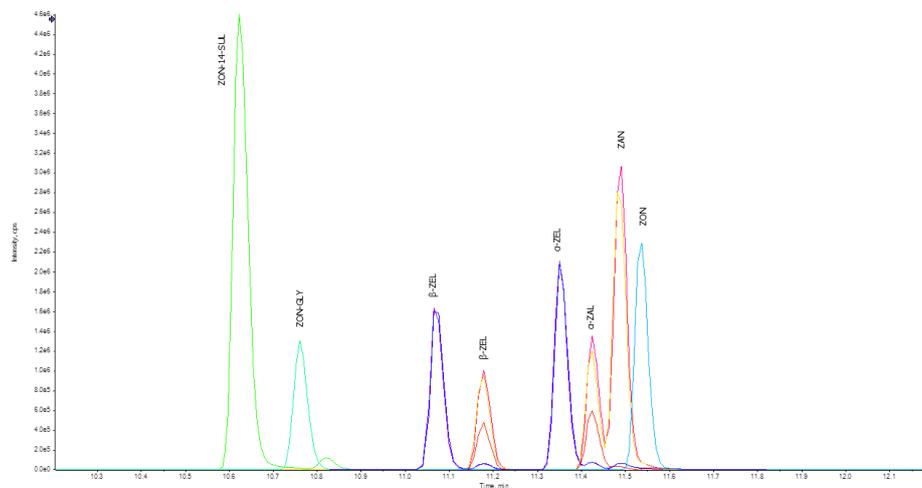
**Abbildung 2** Schematischer Überblick über die um Zearalenon (ZON) und ZON-Metaboliten in Kakao und Schokolade erweiterte Multimethode des CVUA Rheinland.

Die chromatographische Auftrennung der Analyten und die massenspektrometrische Detektion erfolgt unter Verwendung einer Agilent 1260 Infinity II HPLC (Agilent Technologies) gekoppelt mit einem Q-TRAP 6500+ MS/MS-System (AB Sciex) im ESI-negativ Modus. Die Identifizierung und Quantifizierung von ZON sowie dessen Metaboliten erfolgt im scheduled Multiple Reaction Mode (sMRM). Die spezifischen MS-Parameter sind Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1** Analyt spezifische Kenndaten der LC-MS/MS-Methode (Declustering potential = DP, Collision Energy = CE, Cell Exit potential = CXP) - Zearalenon (ZON),  $\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZOL), Zearalanol (ZAN),  $\alpha$ -Zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -Zearalanol ( $\beta$ -ZAL), Zearalenon-o-14- $\beta$ -Glucosid (ZON-GLY) und Zearalenon-14-Sulfat (ZON-SUL). (fett = Quantifyer).

Analyt	t <sub>R</sub> [min]	m/z Vorläuferion	m/z Produktion	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
ZON-SUL	10,54	397,1	<b>317,2</b> / 175,0	-25	-33 / -48	-16 / -12
ZON-GLY	10,70	479,2	<b>317,2</b> / 131,0	-135	-22 / -62	-22 / -6
$\beta$ -ZAL	11,03	321,0	<b>277,3</b> / 303,3	-135	-31 / -30	-18 / -18
$\beta$ -ZOL	11,12	319,1	<b>275,3</b> / 160,0	-130	-29 / -40	-17 / -9
$\alpha$ -ZAL	11,32	321,1	<b>277,3</b> / 303,3	-135	-31 / -30	-18 / -18
$\alpha$ -ZOL	11,37	319,1	<b>160,0</b> / 130,1	-130	-46 / -29	-6 / -17
ZAN	11,47	319,1	<b>275,1</b> / 204,8	-145	-29 / -38	-18 / -15
ZON	11,53	317,2	<b>175,1</b> / 131,2	-80	-30 / -38	-15 / -15

Abbildung 3 zeigt das finale Chromatogramm eines Mischstandards (Wasser:Methanol, 70:30, v/v).



**Abbildung 3** Mischstandard (50 ng/mL bzw. 50  $\mu$ g/kg) - Zearalenon (ZON),  $\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZOL), Zearalanon (ZAN),  $\alpha$ -Zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -Zearalanol ( $\beta$ -ZAL), Zearalenon-o-14- $\beta$ -Glucosid (ZON-GLY) und Zearalenon-14-Sulfat (ZON-SUL).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Methodenentwicklung und Validierung

Zu Beginn der Methodenentwicklung zeigte sich, dass die Aufreinigung mittels IAC zu guten Wiederfindungsraten von ZON (WDF = 119,6 %  $\pm$  6,6 %) in Kakao und Schokolade führte. Jedoch konnte festgestellt werden, dass die eingesetzte IAC mit ZON-Spezifität ZON-Konjugate nicht selektiv bindet. Daher ist die Untersuchung von ZON-GLY und ZON-SUL nach IAC-Aufreinigung nicht möglich (Wiederfindungsrate nahe 0 %).

Ferner zeigen die hohen Wiederfindungsraten der restlichen Metabolite, dass auch diese nur bedingt quantitativ nach Aufreinigung mittels IAC gemessen werden können. Mögliche Ursachen sind die Umlagerungen der einzelnen Metabolite ineinander während der Aufarbeitung sowie starke Matrixeffekte während der Ionisation, die durch nicht strukturanaloge interne Standards (ISTD) nur bedingt kompensiert werden. Dies zeigen die guten Wiederfindungsraten für  $\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZOL) und  $\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZOL) – die einzigen Metaboliten mit strukturanalogen korrespondierenden ISTD ( $\alpha$ -ZOL-D<sub>4</sub> und  $\beta$ -ZOL-D<sub>4</sub>). Zusammenfassend sind die Wiederfindungsraten in Tabelle 2 nach Aufarbeitung unter Verwendung von IAC aufgeführt.

**Tabelle 2** Wiederfindungsraten (WDF, [%]) inklusive Variationskoeffizient (VK, [%]) für Zearalenon (ZON),  $\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZOL), Zearalanon (ZAN),  $\alpha$ -Zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -Zearalanol ( $\beta$ -ZAL), Zearalenon-o-14- $\beta$ -Glucosid (ZON-GLY) und Zearalenon-14-Sulfat (ZON-SUL) in mit 20  $\mu$ g/kg dotierter Trinkschokolade (n = 7) nach IAC-Aufreinigung.

Analyt	Dotierniveau [ $\mu$ g/kg]	Wiederfindung [%]	Variationskoeff. [%]
ZON	20,0	119,6	6,6
$\alpha$ -ZOL	20,0	103,9	1,7
$\beta$ -ZOL	20,0	96,8	1,0
ZAN	20,0	315,4	4,3
$\alpha$ -ZAL	20,0	299,1	6,5
$\beta$ -ZAL	20,0	355,6	5,7
ZON-GLY	20,0	0,0	-
ZON-SUL	20,0	0,0	-

Als Lösungsansatz zur Verbesserung der Wiederfindungsraten wurde ein *Dilute-and-Shoot*-Ansatz nach direkter QuEChERS-Extraktion gewählt (siehe Abbildung 2). Tabelle 3 zeigt die deutlich verbesserten Wiederfindungsraten für die untersuchten ZON-Metaboliten sowie das unmaskierte ZON.

**Tabelle 3** Wiederfindungsraten (WDF, [%]) inklusive Variationskoeffizient (VK, [%]) für Zearalenon (ZON),  $\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZOL), Zearalanon (ZAN),  $\alpha$ -Zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -Zearalanol ( $\beta$ -ZAL), Zearalenon-o-14- $\beta$ -Glucosid (ZON-GLY) und Zearalenon-14-Sulfat (ZON-SUL) in mit 20  $\mu$ g/kg dotierter Trinkschokolade (n = 7) nach QuEChERS-*Dilute-and-Shoot*-Ansatz.

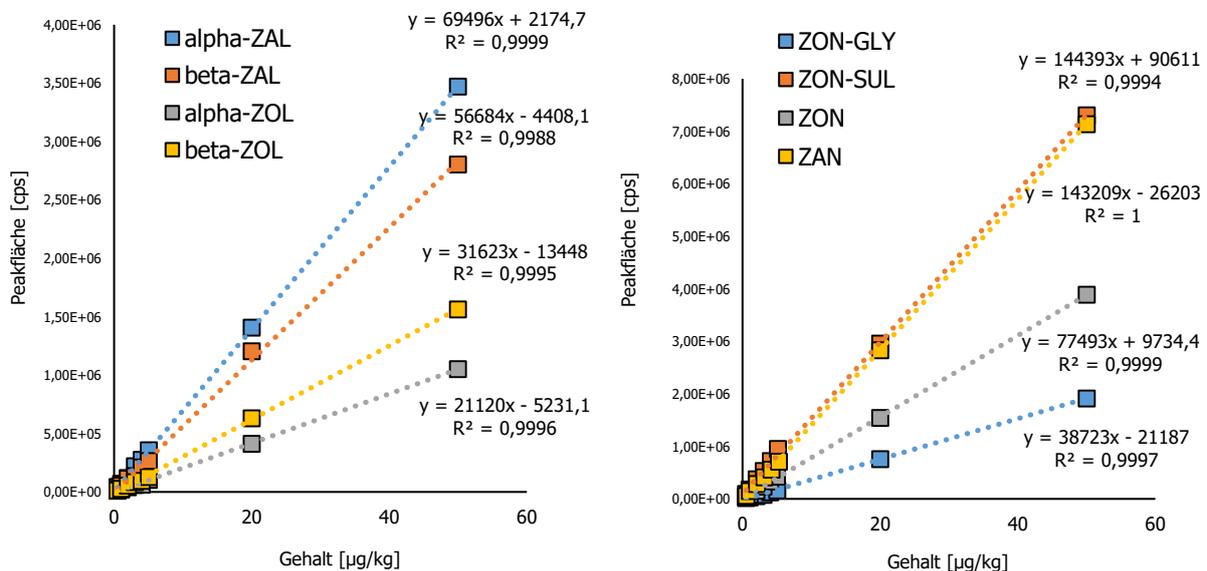
Analyt	Dotierniveau [ $\mu$ g/kg]	Wiederfindung [%]	Variationskoeff. [%]
ZON	20,0	94,0	9,9
$\alpha$ -ZOL	20,0	90,9	7,0
$\beta$ -ZOL	20,0	100,4	8,8
ZAN	20,0	107,3	3,3
$\alpha$ -ZAL	20,0	92,4	2,7
$\beta$ -ZAL	20,0	111,7	5,3
ZON-GLY	20,0	124,9	8,6
ZON-SUL	20,0	80,4	5,1

Anhand von analytspezifischen Kalibriergeraden unter Verwendung der ISTD wurden die Bestimmungsgrenzen (LOQ) abgeschätzt und die Nachweisgrenzen (LOD) per Konvention auf die Hälfte der LOQ festgelegt (s. Tabelle 4).

**Tabelle 4** Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ; beide in µg/kg) für Zearalenon (ZON), α-Zearalenol (α-ZOL), β-Zearalenol (β-ZOL), Zearalanon (ZAN), α-Zearalanol (α-ZAL), β-Zearalanol (β-ZAL), Zearalenon-o-14-β-Glucosid (ZON-GLY) und Zearalenon-14-Sulfat (ZON-SUL) nach QuEChERS-Dilute-and-Shoot-Ansatz.

Analyt	berechnete LOQ [µg/kg]	angegebene LOD [µg/kg]	angegebene LOQ [µg/kg]
ZON	0,71	1,0	2,0
α-ZOL	3,2	2,5	5,0
β-ZOL	3,2	2,5	5,0
ZAN	3,0	2,5	5,0
α-ZAL	0,8	2,5	5,0
β-ZAL	4,9	2,5	5,0
ZON-GLY	3,2	2,5	5,0
ZON-SUL	3,9	2,5	5,0

Die finalen Kalibriergeraden im Konzentrationsbereich von 0,5 µg/kg bis 40,0 µg/kg sind in Abbildung 4 exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 4** Kalibriergeraden (0,5 ng/mL bis 40 ng/mL; bei einer Solleinwaage von 2 g entsprechend 0,5 µg/kg bis 40 µg/kg) - Zearalenon (ZON), α-Zearalenol (α-ZOL), β-Zearalenol (β-ZOL), Zearalanon (ZAN), α-Zearalanol (α-ZAL), β-Zearalanol (β-ZAL), Zearalenon-o-14-β-Glucosid (ZON-GLY) und Zearalenon-14-Sulfat (ZON-SUL).

Als abschließende Richtigkeitskontrolle und in Ermangelung kommerziell erwerblicher Ringversuche wurden verschiedene natürlich mit ZON-belastete Kakao- und Schokoladenproben an andere Labore verschickt, gegengemessen und die Ergebnisse mit den Ergebnissen der hier vorgestellten Methode verglichen.

Der Mini-Laborvergleich bestätigte die Eignung der Methode zur Bestimmung von ZON in Kakao und Schokoladen (s. Tabelle 5) und wird als externe Ergebnisabsicherung der Befunde gewertet.

**Tabelle 5** Ergebnisvergleich der Mini-Laborvergleichsuntersuchung zur Ergebnisabsicherung.

Probe	CVUA ZON [µg/kg]	Labor A ZON [µg/kg]	Labor B ZON [µg/kg]	Labor C ZON [µg/kg]	Mittelwert ZON [µg/kg]	STD ZON [µg/kg] ([%])	"z-Score" CVUA ZON
Schokolade A	21,1	20,4	19,8	28,5	22,5	4,1 (18,1)	-0,34
Schokolade B	50,8	38,7	46,2	43,3	44,8	5,1 (11,4)	1,18
Schokolade C	5,3	4,6	5,5	5,2	5,2	0,4 (7,5)	0,25
Kakaopulver A	25,3	30,9	21,1	28,7	26,5	4,3 (16,1)	-0,28

### 3.2. Datenerhebung

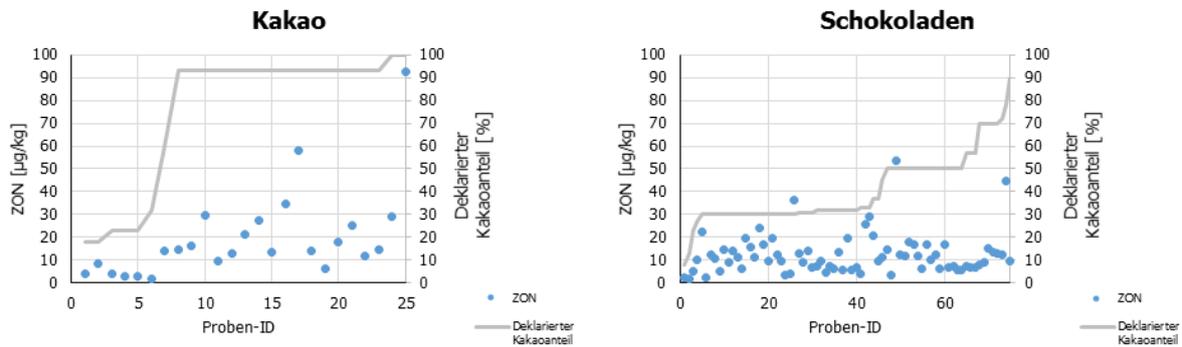
Im Rahmen des Projektzeitraums Mai bis Dezember 2024 wurden insgesamt 75 Schokoladen- und 25 Kakaoprobe auf OTA, ZON und dessen Metaboliten untersucht. Ein Überblick über die nachgewiesenen Gehalte an ZON und OTA zeigt Tabelle 6.

In keiner der 100 untersuchten Proben wurden Spuren von  $\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZOL), Zearalanon (ZAN),  $\alpha$ -Zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -Zearalanol ( $\beta$ -ZAL), Zearalenon-o-14- $\beta$ -Glucosid (ZON-GLY), Zearalenon-14-Sulfat (ZON-SUL) nachgewiesen (LOD = 2,5 µg/kg). Jedoch konnte in allen Proben ZON nachgewiesen (LOD = 1,0 µg/kg) werden, wobei in 98 von 100 Proben der Gehalt oberhalb der Bestimmungsgrenze (2,0 µg/kg) lag!

**Tabelle 6** Übersicht der Ergebnisse für Zearalenon (ZON) und Ochratoxin A (OTA) der im Projektzeitraum untersuchten Proben (Kakaopulver, Vollmilchschokolade, Nusschokolade und Zartbitterschokolade, je n = 25). Bei der statistischen Auswertung der OTA-Befunde wurden Gehalte unterhalb der Nachweisgrenze als 0 µg/kg und Gehalte kleiner der Bestimmungsgrenze als 0,30 µg/kg (50 % der Bestimmungsgrenze, 0,60 µg/kg) gewertet.

Schokoladen (n = 75)	Zearalenon		Ochratoxin A	
	Bezugsgröße: Produkt	Bezugsgröße: 100% Kakao	Bezugsgröße: Produkt	Bezugsgröße: 100% Kakao
Mindestens (µg/kg)	1,8	7,3	0,0	0,0
Median (µg/kg)	10,3	25,0	0,0	0,0
Mittelwert (µg/kg)	12,3	32,7	0,2	0,5
Maximal (µg/kg)	53,8	121,0	1,1	2,4
Anzahl ges. Proben	75	75	75	75
Anzahl pos. Proben	75	75	37	37
Anzahl pos. Proben (%)	100	100	49	49
Kakaopulver (n = 25)	Zearalenon		Ochratoxin A	
	Bezugsgröße: Produkt	Bezugsgröße: 100% Kakao	Bezugsgröße: Produkt	Bezugsgröße: 100% Kakao
Mindestens (µg/kg)	1,9	6,0	0,0	0,0
Median (µg/kg)	13,9	17,5	1,0	1,6
Mittelwert (µg/kg)	19,5	24,5	1,1	1,7
Maximal (µg/kg)	92,8	92,8	3,7	5,4
Anzahl ges. Proben	25	25	25	25
Anzahl pos. Proben	25	25	21	21
Anzahl pos. Proben (%)	100	100	84	84

Abbildung 5 zeigt, dass kein eindeutiger Trend zwischen dem deklarierten Kakao-Anteil und den nachgewiesenen ZON-Gehalten zu erkennen ist.



**Abbildung 5** Abhängigkeit der nachgewiesenen ZON-Gehalte [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] im Vergleich zum deklarierten Kakao-Anteil [%].

Zusätzlich wurden alle Proben auf OTA untersucht. Insgesamt konnten in 49 % aller untersuchten Schokoladenproben (Median:  $< 0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; Maximum:  $1,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) und in 84 % aller Kakaoproben (Median:  $1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; Maximum:  $3,7 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) Spuren an OTA nachgewiesen werden (LOD:  $< 0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; LOQ:  $< 0,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen OTA- und ZON-Gehalten festgestellt werden.

Auf Grundlage des deklarierten Kakaoanteils sowie des seit 01.01.2024 gültigen Höchstgehaltes an OTA in Kakao waren fünf der 100 untersuchten Proben auffällig – hierbei handelte es sich um drei kakaohaltige Getränkpulver mit einem durchschnittlich deklarierten Kakaoanteil von 23 % sowie zwei Backkakaos mit einem durchschnittlich deklarierten Kakaoanteil von circa 93 %.

In Ermangelung rechtsverbindlicher Höchstgehalte für ZON in Kakao- sowie Schokoladenerzeugnissen wird zur vorläufigen Beurteilung der nachgewiesenen Gehalte der 2011 vom CONTAM Panel der Europäischen Union veröffentlichte *tolerable daily intake* (TDI) von  $0,25 \mu\text{g}$  ZON pro kg Körpergewicht und Tag herangezogen. [7] Ferner werden die vom BfR 2007 veröffentlichten Verzehrdaten an Schokoladenerzeugnissen berücksichtigt, wobei zu beachten ist, dass keine Unterscheidung zwischen Schokoladenarten bei den durchschnittlichen Verzehrsmengen pro Tag und Alter getroffen wurden. [10]

Der Vergleich der Untersuchungsergebnisse des CVUA Rheinland mit dem vom CONTAM Panel veröffentlichten TDI - aufgeführt in Tabelle 7 - zeigt insbesondere für Kleinkinder, die generell als Vielverzehrer von Schokoladenerzeugnissen gewertet werden können, die toxikologische Relevanz von ZON in Schokoladenerzeugnisse.

So werden unter Berücksichtigung des Median der nachgewiesenen ZON-Gehalte bei Kleinkindern (3 Jahre) mit durchschnittlicher Verzehrsmenge ( $20,9 \text{ g}$  pro Tag) circa 8,6 % des TDI bereits durch den Verzehr von Schokoladenerzeugnissen ausgeschöpft. Bei Vielverzellern (95. Perzentil;  $56 \text{ g}$  pro Tag) kann dieser Wert auf circa 23,0 % ansteigen. Die höchste nachgewiesene Konzentration an ZON in Schokolade würde zu einer Ausschöpfung von 45,0 % beziehungsweise 120,5 % des TDI bei Kleinkindern führen!

**Tabelle 7** Abschätzung der Ausschöpfung der tolerierbaren täglichen Aufnahmemenge an Zearalenon (ZON) durch den Verzehr von Schokoladenerzeugnissen. Abkürzungen: KG = Körpergewicht.

	Durchschnittlicher Verzehrer (Schokolade)			Vielverzehrer (Schokolade)		
	Kleinkind ~3 Jahre alt	Kind ~8 Jahre alt	Erwachsener	Kleinkind ~3 Jahre alt	Kind ~8 Jahre alt	Erwachsener
<b>Körpergewicht [9]</b> [kg]	10	22	60	10	22	60
<b>Verzehrmenge [10]</b> [g pro Kopf und Tag]	20,9	22,5	19,0	56,0	62,1	65,0
<b>Tolerierbare tägl. Aufnahmemenge [7]</b> [µg/kg KG und Tag]	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>Nachgewiesener ZON-Gehalt (Median)</b> [µg/kg]	10,3	10,3	10,3	10,3	10,3	10,3
<b>Nachgewiesener ZON-Gehalt (Maximum)</b> [µg/kg]	53,8	53,8	53,8	53,8	53,8	53,8
<b>Tägliche Aufnahme- menge Median ZON</b> [µg/kg KG und Tag]	0,02	0,01	0,00	0,06	0,03	0,01
<b>Tägliche Aufnahme- menge Maximal ZON</b> [µg/kg KG und Tag]	0,11	0,06	0,02	0,30	0,15	0,06
<b>Ausschöpfung des TDI Median ZON</b> [%]	8,6	4,2	1,3	23,0	11,6	4,5
<b>Ausschöpfung des TDI Maximal ZON</b> [%]	45,0	22,0	6,8	120,5	60,8	23,3

Die nachgewiesenen Gehalte an ZON in Kakao wurden in dieser Abschätzung nicht mitberücksichtigt, da keine belastbaren Verzehrdaten für Kakaopulver vorlagen. Des Weiteren führen die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von Kakaopulver zu einer hohen Streuung hinsichtlich der täglichen Verzehrsmengen (zum Beispiel in kakaohaltigen Getränkepulvern, Feinen Backwaren). Allerdings sollten die zum Teil hohen Gehalte in Kakao (bis zu 92,8 µg/kg) in einer zukünftigen Risikobewertung mitberücksichtigt werden, um die Exposition nicht zu unterschätzen.

Ferner ist in dieser Abschätzung die weitere Aufnahme von ZON durch andere Lebensmittel, wie zum Beispiel Maisprodukte (allen voran Maisstangen oder ähnliches), die ebenfalls von Kleinkindern verstärkt verzehrt werden und die in der Literatur als potentielle ZON-Quelle beschrieben sind, nicht berücksichtigt. [7]

Die Untersuchungsergebnisse des CVUA Rheinland zeigen jedoch keine Auffälligkeiten für ZON in Getreide und Getreideerzeugnissen in den letzten Untersuchungsjahren.

## Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse dieses Untersuchungsprojektes wird ZON zukünftig in das Routine-Untersuchungsspektrum für Kakao- und Schokoladenerzeugnisse mit Untersuchungsziel Mykotoxine am CVUA Rheinland aufgenommen. Zur Geräteschonung und Reduzierung des anfallenden Wartungsaufwands soll jedoch eine IAC-Reinigung für ZON, OTA und Aflatoxine etabliert werden - eine Kombisäule mit passenden Antikörpern sowie strukturanaloge <sup>13</sup>C-markierte ISTD ist kommerziell verfügbar. Auf eine routinemäßige Untersuchung der ZON-Metaboliten wird zukünftig verzichtet.

Die hohen ZON-Gehalte in Verbindung mit den hohen Nachweishäufigkeiten in Schokoladenerzeugnissen lassen insbesondere bei Kleinkindern mit hohen Verzehrsmengen an Schokolade eine verstärkte Ausschöpfung des TDI hinsichtlich ZON befürchten, die so vor Projektbeginn nicht bekannt war. Die alleinige Betrachtung von Getreideerzeugnissen führt daher zu einer deutlichen Unterschätzung der ZON-Exposition. Die Untersuchungsergebnisse sollten daher zu einer weitergehenden toxikologischen Bewertung an das Bundesamt für Risikobewertung übermittelt werden.

## 4. Literatur

- [1] Abreu D C P, Vargas E A, da Silva Oliveira F A, Madureira F D Gomes M B et al. Validation and estimation of uncertainty of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 34 mycotoxins in cocoa beans. *Food Chemistry* 2023, **399**: 133902.
- [2] Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G et al. Masked mycotoxins: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, **57**: 165-186
- [3] Schwake-Anduschus C, Proske M, Sciarba E, Muenzing K, Koch M et al. Distribution of deoxynivalenol, zearalenone, and their respective modified analogues in milling fractions of naturally contaminated wheat grains. *World Mycotoxin Journal* 2015, **8 (4)**: 433-443
- [4] Poppenberger, B. et al., Glossl, J. und Adam, G., 2006. Heterologous expression of Arabidopsis UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4404-4410.
- [5] Hillenbrand A, 2012. Neuartige oxidative Metaboliten von Zearalenon und -Zearalanol: Strukturen und Reaktivitäten. Dissertation, Mannheim.
- [6] Carballo D, Pallarés N, Ferrer E, Barba F J, Berrada H. Assessment of Human Exposure to Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Zearalenone and Their Metabolites Biomarker in Urine Samples Using LC-ESI-qTOF. *Toxins* 2021, **13, 530**: 1-10.
- [7] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA Journal* 2016, **14 (4)**: e04425 p. 1-46
- [8] Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P, 2007 (6. Auflage). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Verlage Berlin.
- [9] Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Assessing the risk of chemicals to Children's Health: OECD-wide survey 2021 Survey Report. OECD ENV/CBC/MONO(2023)8
- [10] Stellungnahme Nr. 015/2007 des BfR vom 31.01.2007

## 5. Anhang

Lfd. Nr.	Produkt	deklarerter Kakaoanteil [%]	OTA [µg/kg]	α-ZAL [µg/kg]	β-ZAL [µg/kg]	ZAN [µg/kg]	α-ZOL [µg/kg]	β-ZOL [µg/kg]	ZON-SUL [µg/kg]	ZON-GLY [µg/kg]	ZON [µg/kg]
1	Getränkpulver	18	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	4,1
2	Getränkpulver	18	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	8,3
3	Getränkpulver	23	1,24	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	3,8
4	Getränkpulver	23	0,85	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	3,1
5	Getränkpulver	23	0,78	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	2,7
6	Schokoladenpulver	32	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	„1,9“
7	Kakaopulver	60	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	13,9
8	Kakaopulver	93	1,48	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	14,5
9	Kakaopulver	93	1,07	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	16,3
10	Kakaopulver	93	3,65	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	29,9
11	Kakaopulver	93	1,79	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,5
12	Kakaopulver	93	1,73	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	12,9
13	Kakaopulver	93	0,92	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	21,3
14	Kakaopulver	93	1,87	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	27,4
15	Kakaopulver	93	1,66	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	13,3
16	Kakaopulver	93	2,87	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	34,7
17	Kakaopulver	93	1,04	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	57,9
18	Kakaopulver	93	1,96	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	13,8
19	Kakaopulver	93	0,98	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,2
20	Kakaopulver	93	1,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	18,2
21	Kakaopulver	93	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	25,1
22	Kakaopulver	93	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	11,9
23	Kakaopulver	93	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	14,5
24	Kakaopulver	100	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	28,9
25	Kakaopulver	100	0,77	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	92,8
1	Vollmilchschokolade	8	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	2,6
2	Vollmilchschokolade	13	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	„1,8“
3	Nusschokolade (weiß)	22,75	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	5,2
4	Nusschokolade	27	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	10,2
5	Vollmilchschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	22,5
6	Vollmilchschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	2,6
7	Vollmilchschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	12,4
8	Vollmilchschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	10,8
9	Vollmilchschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	4,9
10	Vollmilchschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	14,4
11	Vollmilchschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,3

Lfd. Nr.	Produkt	deklarerter Kakaanteil [%]	OTA [µg/kg]	α-ZAL [µg/kg]	β-ZAL [µg/kg]	ZAN [µg/kg]	α-ZOL [µg/kg]	β-ZOL [µg/kg]	ZON-SUL [µg/kg]	ZON-GLY [µg/kg]	ZON [µg/kg]
12	Vollmilchschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	13,9
13	Nusschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	11,2
14	Nusschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,1
15	Vollmilchschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	19,6
16	Vollmilchschokolade	30	0,73	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	15,6
17	Nusschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	11,1
18	Nusschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	24,1
19	Nusschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	16,7
20	Nusschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,7
21	Nusschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	19,4
22	Vollmilchschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	12,5
23	Nusschokolade	30	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,7
24	Vollmilchschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	3,7
25	Nusschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	4,1
26	Vollmilchschokolade	30	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	36,3
27	Vollmilchschokolade	31	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	13,0
28	Vollmilchschokolade	31	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,3
29	Vollmilchschokolade	31	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	14,2
30	Vollmilchschokolade	31	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,8
31	Nusschokolade	32	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	7,5
32	Nusschokolade	32	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,7
33	Nusschokolade	32	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	4,4
34	Nusschokolade	32	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	7,2
35	Vollmilchschokolade	32	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,0
36	Nusschokolade	32	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	13,3
37	Nusschokolade	32	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	5,5
38	Nusschokolade	32	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	19,5
39	Nusschokolade	32	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	5,7
40	Nusschokolade	32	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,8
41	Nusschokolade	33	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	3,9
42	Vollmilchschokolade	33	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	25,6
43	Vollmilchschokolade	33	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	29,1
44	Vollmilchschokolade	37	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	20,8
45	Vollmilchschokolade	37	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,8
46	Zartbitterschokolade	45	0,80	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	11,5
47	Zartbitterschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	14,7
48	Nusschokolade	50	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	3,7
49	Zartbitterschokolade	50	0,79	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	53,8

Lfd. Nr.	Produkt	deklarerter Kakaanteil [%]	OTA [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	$\alpha$ -ZAL [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	$\beta$ -ZAL [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	ZAN [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	$\alpha$ -ZOL [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	$\beta$ -ZOL [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	ZON-SUL [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	ZON-GLY [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	ZON [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
50	Nussschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	12,1
51	Zartbitterschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	11,8
52	Zartbitterschokolade	50	0,77	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	17,9
53	Zartbitterschokolade	50	1,08	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	16,6
54	Zartbitterschokolade	50	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	11,8
55	Zartbitterschokolade	50	0,65	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,3
56	Zartbitterschokolade	50	1,12	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	17,1
57	Zartbitterschokolade	50	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	10,3
58	Zartbitterschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	12,5
59	Zartbitterschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,0
60	Zartbitterschokolade	50	0,89	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	16,8
61	Zartbitterschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,9
62	Nussschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	7,2
63	Zartbitterschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	5,9
64	Zartbitterschokolade	50	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	5,8
65	Nussschokolade	57	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	7,2
66	Nussschokolade	57	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,9
67	Nussschokolade	57	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	7,1
68	Zartbitterschokolade	70	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	7,9
69	Zartbitterschokolade	70	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,1
70	Zartbitterschokolade	70	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	15,3
71	Zartbitterschokolade	70	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	13,7
72	Zartbitterschokolade	70	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	13,1
73	Zartbitterschokolade	72	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	12,6
74	Zartbitterschokolade	78	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	44,9
75	Zartbitterschokolade	90	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	9,4
Zusätzlich	Dubai Schokolade	k.A.	<0,20	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,3
Zusätzlich	Dubai Schokolade	k.A.	1,75	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	6,4
Zusätzlich	Dubai Schokolade	k.A.	<0,60	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	11,1