



Bundesministerium
für Landwirtschaft, Ernährung
und Heimat



Schlussbericht zum Thema

Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren

FKZ: 2818NA004, 2818NA005, 2818NA006, 2818NA007

Projektnehmer/Projektnehmerin:

Ludwig-Maximilians-Universität München,
Max Rubner-Institut Bundesforschungsinstitut für Ernährung und
Lebensmittel,
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR),
Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Gefördert durch das Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat auf Grund eines Beschlusses des deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische Landwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat (BMLEH) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in die Praxis umgesetzt. Das Programm gliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder - das Forschungs- und das Informationsmanagement.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter:

www.bundesprogramm.de
www.oekolandbau.de/forschung

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Bundesprogramm Ökologischer Landbau
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel.: 0228-6845-3280
E-Mail: boel-forschung@ble.de

Titel des Vorhabens	Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren (Akronym: PA-SAFE-FEED)
Arbeitspaket II: Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse Arbeitspaket III: Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten	
Förderkennzeichen	2818NA004, 2818NA005, 2818NA007
Laufzeit des Vorhabens	2019/07-2024/03
Ausführende Stellen	Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und -analytik Ludwig-Maximilians-Universität München Oberschleißheim (FKZ: 2818NA004) Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel – Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Kiel (FKZ: 2818NA005) Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Tierernährung, Braunschweig (FKZ: 2818NA007)

Gefördert durch



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Kurzzusammenfassung

Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren

(Akronym: PA-SAFE-FEED)

Arbeitspaket II und III:

Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse

Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten

Dr. Angelika Miriam Knispel

Lisa Monika Klein

Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und
-analytik

Schönleutnerstraße 8

85764 Oberschleißheim, D

sekretariat@ls.vetmed.uni-muenchen.de

Dr. Karin Knappstein

Dr. Stefan Nöbel

Dr. Julika Lamp

Max Rubner-Institut

Bundesforschungsinstitut für Ernährung und
Lebensmittel, Institut für Sicherheit und Qualität bei
Milch und Fisch

Hermann-Weigmann-Straße 1

24103 Kiel, D

karin.knappstein@mri.bund.de

Es wurde eine Statuserhebung in den Modellregionen Bayern und Schleswig-Holstein durchgeführt, um die Belastung von Milch einzelner Milcherzeugerbetriebe (Kuhmilch) mit Pyrrolizidinalkaloiden (PA) und -N-Oxiden (PANO) zu untersuchen. Die Probennahme erfolgte während vier Saisons. Es zeigte sich eine geringe PA/PANO-Belastung mit einem mittlerem PA/PANO-Gesamtgehalt von 0,034 µg/L in aller untersuchten Proben. In 11% der Proben wurden PA/PANO nachgewiesen, mit Gehalten zwischen 0,007 und 5,6 µg/L.

Aus PA/PANO-kontaminierter Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch wurden typische Milchprodukte (Joghurt, Käse) hergestellt und der Verbleib der PA/PANO während der Herstellungsprozesse untersucht. Es zeigte sich, dass die Verarbeitung von kontaminierter Milch auch zu kontaminierten Milchprodukten führte. Durch die Fermentationen bei der Joghurt- und Käseherstellung kommt es zu einer Reduktion des PANO Senecionin-N-Oxid zum PA Senecionin. Insgesamt erfolgte die PA-Verteilung während der Käseherstellung zu einem großen Anteil mit der wässrigen Phase, hierdurch war auch die Molke im gleichen Maß wie die Milch kontaminiert.

Brief summary

Studies on the transfer of pyrrolizidine alkaloids in livestock

(Acronym: PA-SAFE-FEED)

Work package II and III:

Collection and analysis of field samples, status analysis

Production and analysis of dairy products

Dr. Angelika Miriam Knispel
Lisa Monika Klein

LMU Munich

Chair of Food Safety and Analytics
Schönleutnerstraße 8
85764 Oberschleißheim, Germany
sekretariat@ls.vetmed.uni-muenchen.de

Dr. Karin Knappstein
Dr. Stefan Nöbel
Dr. Julika Lamp

Max Rubner-Institut

Department of Safety and Quality of Milk and Fish
Products, Max Rubner-Institut, Federal Research
Institute of Nutrition and Food
Hermann-Weigmann-Straße 1
24103 Kiel, Germany
karin.knappstein@mri.bund.de

A status survey was carried out in the model regions of Bavaria and Schleswig-Holstein to investigate the contamination of milk from individual dairy farms (cow's milk) with pyrrolizidine alkaloids (PA) and N-oxides (PANO). Samples were taken over four seasons. PA/PANO contamination was found to be low, with an average total PA/PANO content of 0.034 µg/L in all samples analyzed. PA/PANO was detected in 11% of the samples, with levels between 0.007 and 5.6 µg/L.

Typical dairy products (yoghurt, cheese) were produced from PA/PANO-contaminated cow's, sheep's and goat's milk and the fate of PA/PANO during the production processes was investigated. It was found that the processing of contaminated milk also led to contaminated dairy products. The fermentations during yoghurt and cheese production lead to a reduction of the PANO senecionine N-oxide to the PA senecionine. Overall, the PA distribution during cheese production took place to a large extent with the aqueous phase, as a result of which the whey was also contaminated to the same extent as the milk.

Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren

(Akronym: PA-SAFE-FEED)

Arbeitspaket II:

Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse

Arbeitspaket III:

Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten

Schlussbericht

Laufzeit des Vorhabens:

Juli 2019 bis März 2024

Förderkennzeichen:

2818NA004, 2818NA005, 2818NA007

Gefördert durch



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung.....	1
1.1. Gegenstand des Vorhabens	1
1.2. Ziele und Aufgabenstellungen des Projektes: Bezug des Vorhabens zu einschlägigen Zielen des BÖL	2
1.3. Planung und Ablauf des Projektes	3
1.3.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse	3
1.3.2. Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten	4
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde.....	6
3. Material und Methoden	10
3.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse	10
3.1.1. Probennahme.....	10
3.1.2. Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden und -N-Oxiden in den Milchproben.....	11
3.1.2.1. Referenzstandards und Chemikalien	11
3.1.2.2. Probenvorbereitung	13
3.1.2.3. Probenmessung	14
3.2. Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten	16
3.2.1. Herstellung von Milchprodukten (MRI).....	16
3.2.1.1. Herstellung von natürlich kontaminierten Milchprodukten aus Milchen der Transferstudien	16
3.2.1.2. Herstellung von Milchprodukten aus künstlich kontaminierter Milch.....	21
3.2.2. Bestimmung der Milchinhaltsstoffe und Produktparameter (MRI)	22
3.2.3. PA/PANO-Analytik.....	22
3.2.3.2. PA/PANO-Analytik von Joghurt und Käse aus natürlich und künstlich kontaminierter Schaf- und Ziegenmilch	24
4.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse	29
4.2. Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten	34
4.2.1. Herstellung von Milchprodukten (MRI).....	34
4.2.2. Bestimmung der Milchinhaltsstoffe und Produktparameter (MRI)	35
4.2.3. PA/PANO-Analytik.....	38
4.2.3.1. PA/PANO-Analytik der Probensets Joghurt und Schnittkäse Typ Edamer aus künstlich und natürlich kontaminierter Kuhmilch.....	38
4.2.3.2. PA/PANO-Analytik der Probensets Joghurt, Weichkäse Typ Picodon, Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego aus natürlich und künstlich kontaminierter Ziegen- und Schafmilch	47
5. Diskussion.....	75
5.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse	75

5.2.	Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten	79
5.2.1.	Bestimmung der Milchinhaltsstoffe und Produktparameter (MRI)	80
5.2.2.	Auswahl der PA/PANO für die künstliche Kontamination	80
5.2.3.	PA/PANO-Analytik.....	81
5.2.3.1.	Analysemethoden zur PA/PANO-Analytik in Milchprodukten	81
5.2.3.2.	Verhalten von PA/PANO während der Herstellung von Milchprodukten.....	84
6.	Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse	96
7.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen .	97
8.	Zusammenfassung	100
8.1.	Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse	100
8.2.	Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten	100
9.	Literaturverzeichnis	102
10.	Übersicht aller bisheriger Veröffentlichungen.....	107

1. Einführung

1.1. Gegenstand des Vorhabens

In den letzten Jahren haben zahlreiche Behörden der Lebensmittel- und Futtermittelüberwachung auf Kreis- und Landesebene mit zunehmender Besorgnis die Ausbreitung von Kreuzkräutern (*Senecio/Jacobaea* spp.) verfolgt. Kreuzkräuter wie das Jakobskreuzkraut (*Jacobaea vulgaris* Gaertn., syn. *Senecio jacobaea* L.) oder das Wasserkreuzkraut (*J. aquatica* (Hill) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., syn. *S. aquaticus*) enthalten lebertoxische und kanzerogen wirksame Pyrrolizidinalkaloide (PA) und deren *N*-Oxide (PANO). Diese können bereits in sehr geringen Dosen die Gesundheit von Mensch und Tier beeinträchtigen. In bestimmten Regionen Deutschlands sind Wirtschaftsgrünland oder extensiv bewirtschaftete Weideflächen häufig mit PA/PANO-haltigen Kreuzkräutern bewachsen, was zu einer Exposition von Tieren durch belastete Raufutter (Silage, Heu) oder während der Weidehaltung führen kann. Dies stellt sowohl ein Risiko für die Tiergesundheit als auch für den Verbraucher dar, der PA/PANO möglicherweise über Lebensmittel tierischen Ursprungs aufnehmen kann.

Senecio/Jacobaea-Pflanzen verbreiten sich durch die Produktion großer Mengen flugfähiger Samen mit hoher Keimfähigkeit. Gleichzeitig besitzen Kreuzkräuter einen geringen Anspruch an die Bodenqualität, wodurch sie leicht Brachflächen und extensiv genutzte Flächen besiedeln können. Diese Problematik betrifft den ökologischen Landbau besonders stark, da im Gegensatz zum konventionellen Landbau keine chemisch- synthetischen Pflanzenschutzmittel verwendet werden dürfen und stattdessen auf mechanische oder biologische Bekämpfungsmethoden zurückgegriffen werden muss.

Die derzeitige Datenbasis zur Gefährdungsbeurteilung für verschiedene Nutztiere sowie zum Transfer in Lebensmittel tierischen Ursprungs wird als lückenhaft betrachtet, was eine zuverlässige Risikobewertung von PA/PANO-Gehalten in Futtermitteln derzeit erschwert.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieses Projektes, Fütterungsstudien zur Bewertung schädlicher PA/PANO-Gehalte in Futtermitteln für Kühe, Schafe und Ziegen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien sollen dazu dienen, ein besseres Verständnis für das Vorkommen von PA/PANO in Futter- und Lebensmitteln tierischen Ursprungs zu entwickeln. Dies wird dazu beitragen, die betroffenen Produktionszweige zu unterstützen, insbesondere Landwirtschaftsbetriebe, um die notwendigen Qualitätssicherungsmaßnahmen zu ergreifen. Durch eine verbesserte Datengrundlage zu tolerierbaren Gehalten in Futtermitteln können Orientierungswerte geschaffen werden, um insgesamt zur Verbesserung von Tiergesundheit und Verbraucherschutz beizutragen.

1.2. Ziele und Aufgabenstellungen des Projektes: Bezug des Vorhabens zu einschlägigen Zielen des BÖL

Das Projekt sah die vergleichenden Untersuchungen zum Vorkommen von PA/PANO in Milchproben von konventionell und ökologisch wirtschaftenden Milchviehbetrieben in Grünlandregionen von Schleswig-Holstein und Bayern vor. Dabei sollte eine Statuserhebung über die PA/PANO-Belastung von Kuhmilch aus ökologisch und konventionell geführten Betrieben erstellt und mögliche Ursachen des PA/PANO-Vorkommens analysiert werden. In diesem Kontext war ein proaktiver Ansatz von hoher Bedeutung. Die generierten Daten bilden, auch in Verbindung mit der Feststellung eines PA/PANO-Transfers in die Milch aus den Transferstudien dieses Projektes, eine Grundlage für die Bewertung eines potenziellen Risikos einer PA/PANO-Exposition durch Milchverzehr. Zusätzlich wurden Untersuchungen zum Verhalten von PA/PANO bei der Herstellung von Milchprodukten aus belasteter Milch durchgeführt (Joghurt, Käse).

Ökologisch agierende Betriebe sind durch die Entsorgung von kontaminiertem Gründlandaufwuchs und dem notwendigen Zukauf von Futtermitteln aus anderen Bezugsquellen mit einer zusätzlichen finanziellen Belastung konfrontiert, was ihre Wettbewerbsfähigkeit beeinträchtigt. Die Erkenntnisse aus den durchgeführten Studien können sowohl den landwirtschaftlichen Betrieben als auch den verantwortlichen Behörden als Entscheidungshilfen für das Grünlandmanagement und die Tierfütterung dienen, wodurch geeignete Managementmaßnahmen abgeleitet werden können.

Ein weiteres Ziel ist die Verbesserung der Qualität tierischer Erzeugnisse, um den Erwartungen der Verbraucher hinsichtlich Lebensmittelsicherheit gerecht zu werden. Dabei steht die Erfüllung der Verbrauchieranforderungen im Mittelpunkt, während gleichzeitig die ökologischen Prinzipien berücksichtigt werden. Darüber hinaus befasst sich das Projekt mit der Weiterentwicklung von Qualitätssicherungssystemen entlang der Wertschöpfungskette im Rahmen der Vermarktung ökologisch erzeugter Produkte. Hierzu wurden Transferstudien mit Wiederkäuern durchgeführt und Daten zum Transfer in Lebensmittel tierischer Herkunft erhoben, um die Sicherheit und Qualität dieser Produkte besser einordnen und ggf. Maßnahmen ableiten zu können.

1.3. Planung und Ablauf des Projektes

Der Arbeitsplan gliederte sich über den gesamten Projektzeitraum in drei Arbeitspakete (AP), die parallel an den beteiligten Forschungsstellen bearbeitet wurden. In diesem Bericht werden Arbeitspaket II „Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse“ und Arbeitspaket III „Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten“ behandelt.

1.3.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse

Aus vorhandenen Studien geht hervor, dass Milchproben aus dem Einzelhandel mit PA/PANO belastet sein können (Huybrechts & Callebaut 2015; Mulder et al. 2015). Es bleibt jedoch unklar, ob diese Kontaminationen durch hohe Belastungen der Milch von einzelnen Betrieben oder durch geringfügige Kontaminationen in einer Vielzahl von Betrieben verursacht wurden.

Innerhalb des Projekts wurde die Analyse von Milchproben von individuellen Erzeugern auf das Vorhandensein von PA/PANO durchgeführt. Die ausgewählten Regionen stellten repräsentative Grünlandregionen dar, da die Ausbreitung von Kreuzkraut (Jakobskreuzkraut bzw. Wasserkreuzkraut) besonders bei der Bewirtschaftung von Dauergrünland erwartet wird. Diese Untersuchungen sind von besonderem Wert, da die Ergebnisse der Feldproben das Vorhandensein von *Senecio/Jacobaea*-PA/PANO zeigten und die Resultate der Transferstudien in der Praxis bestätigen können. Schleswig-Holstein und Bayern wurden als Modellregionen herangezogen. Bei der Auswahl geeigneter Betriebe waren die Milcherzeugervereinigung Schleswig-Holstein e.V., der Milchprüfing Bayern e.V. sowie der Bioland Verband einbezogen.

Obwohl Weiderinder aufgrund der Gehalte an Bitterstoffen normalerweise die Aufnahme der PA/PANO-haltige Pflanzen vermeiden, kann eine Aufnahme durch Beifraß auf entsprechend belasteten Flächen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Tiere können keine Selektion aus kontaminierten Futterkonservaten wie Heu und Silage vornehmen. Um mögliche Belastungen zu vergleichen, wurde die Probenahme in je zwei Winterhalbjahren und zwei Sommerhalbjahren durchgeführt. Dabei wurden konventionelle und ökologisch wirtschaftende Betriebe einbezogen. Bei den ökologischen Betrieben besteht die Pflicht zur Gewährleistung von Zugang zu Weideflächen zusätzlich bestehen nur eingeschränkten Möglichkeiten zum Pflanzenschutz, was bezogen auf mögliche PA/PANO-Kontaminationen als ein erhöhtes Risiko zu sehen ist.

Die Analytik der gezogenen Milchproben erfolgt unter Anwendung der zielgerichteten Analytik (LC-MS/MS), die im Rahmen von Arbeitspaket 1 zur Analytik von PA/PANO in Milch entwickelt wurde (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I).

1.3.2. Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten

In einer Untersuchung der EFSA (2015) wurden vereinzelt in Milchproben aus verschiedenen EU-Mitgliedsstaaten, jedoch nicht in Milchprodukten, (u.a. Joghurt, Käse, Säuglingsnahrung) Gehalte an PA/PANO nachgewiesen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass bei der Verarbeitung von Milch in der Regel eine beträchtliche Verdünnung von Milch aus unterschiedlichen Betrieben in den Molkereien geschieht (Mulder et al. 2015). Im Gegensatz dazu wird die Milch bei Direktvermarktung ohne weitere Verdünnung durch Milch von anderen Erzeugern verarbeitet und in Form von Milchprodukten direkt an Verbraucher abgegeben. Daher erscheint hier das Risiko eines PA/PANO-Vorkommens höher. Besonders die Milch von kleinen Wiederkäuern und daraus erzeugte Milchprodukte werden häufig direkt verarbeitet. Erste Ergebnisse zur Stabilität von PA/PANO bei der Pasteurisierung und UHT-Behandlung von kontaminierter Kuhmilch sowie bei der Herstellung von Joghurt und Käse wurden von de Nijs et al. (2017) publiziert. Es sollte jedoch beachtet werden, dass nur sehr wenig Probenmaterial zur Verfügung stand, sodass sich lediglich Tendenzen ableiten ließen (de Nijs et al. 2017). Aus diesem Grund wurden im vorliegenden Arbeitspaket umfangreiche Versuche zur Milchtechnologie und zum Verbleib von PA/PANO durchgeführt.

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde PA/PANO-kontaminierte Milch zu Milchprodukten verarbeitet. Dabei wurde als Ausgangsmilch Milch aus den Transferstudien (Arbeitspaket I) sowie künstlich mit PA/PANO-kontaminierte Milch verwendet. Um darzustellen, dass es sich um marktübliche Produkte handelt, wurden typische Produkteigenschaften wie z.B. Fettgehalt bestimmt. Folgende Produkte (Tabelle 1) wurden auf Grund des Angebots durch Direktvermarkter sowie der Unterschiede im Herstellungsverfahren ausgewählt:

Tabelle 1: Milchprodukte hergestellt aus PA/PANO-kontaminierter Milch

	Rinder	Ziegen	Schafe
Joghurt	Joghurt	Joghurt	-
Käse	Halbfester Schnittkäse (Typ Edamer)	Weichkäse (Typ Picodon)	Weichkäse (Typ Feta)
			Hartkäse (Typ Manchego)

Bei den Käse- und Joghurtherstellungen wurden die Ausgangsmilch, das Endprodukt und relevante Zwischenstufen beprobt, um die PA/PANO-Veränderungen während der Milchverarbeitung nachzuvollziehen. Parallel zur Joghurtherstellung wurde ein chemisch gesäuertes Äquivalent hergestellt, welches im Folgenden als „Milchgel“ bezeichnet wird. Das Milchgel wurde durch Zugabe von Glucono-delta-lacton gesäuert, der Joghurt wurde durch mikrobielle Fermentation hergestellt. Somit stellte das Milchgel eine gesäuerte Kontrolle zum Joghurt da, die ohne Beteiligung von mikrobiellen Prozessen hergestellt wurde. Das erlaubte die Differenzierung, ob eine Veränderung in der PA/PANO-Konzentration und Komposition bei der Herstellung durch den Effekt der Säuerung oder den mikrobiellen Fermentationsreaktionen verursacht wird.

Zur PA/PANO-Analytik der Milchprodukte und relevanten Zwischenstufen war es vor Beginn der Probenanalyse größtenteils erforderlich die in 1.3.1. entwickelte LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von PA/PANO in Milch für die komplexen Matrices der Käse- und Joghurtherstellung anzupassen.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind eine Gruppe von über 600 verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Sie werden weltweit von Pflanzen aus der Familie der Asteraceae, Boraginaceae und Leguminosae als Fraßgifte gebildet. Es wird geschätzt, dass es insgesamt etwa 6000 Pflanzen weltweit gibt, die PA enthalten (Mulder et al. 2015; Smith & Culvenor 1981). PA sind wahrscheinlich die am weitesten verbreiteten natürlichen Toxine und können durch Kontamination von Lebens- und Futtermitteln sowohl wildlebende Tiere und Nutztiere als auch den Menschen schädigen (FAO 2010). Relevante PA/PANO-haltige Pflanzen in Deutschland sind vorwiegend Kreuzkräuter (*Senecio/Jacobaea spp.*). Diese heimischen Pflanzen gehören zur Familie der Korbblütler (Asteraceae). Typische Vertreter davon sind Jakobskreuzkraut (*J. vulgaris Gaertn.*, syn. *S. jacobaea L.*), Gemeines Kreuzkraut (*S. vulgaris L.*) und Frühlingskreuzkraut (*S. vernalis Waldst. & Kit.*). Zudem ist das Wasserkreuzkraut (*J. aquatica (Hill) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.*, syn. *S. aquaticus Hill*) anzutreffen, welches in feuchten Habitaten wächst, und das eingewanderte schmalblättrige Kreuzkraut (*S. inaequidens DC.*). In Pflanzen liegen PA überwiegend als N-Oxide (PANO) vor. Den PANO wird dasselbe toxische Potential wie den korrespondierenden PA zugeschrieben, da es nach Exposition zu einer bakteriellen Reduktion im Darm kommt (Wang et al. 2005). PA, die typischerweise von *Senecio/Jacobaea*-Pflanzen gebildet werden, sind in Abbildung 1 dargestellt.

Bei PA/PANO handelt es sich um Ester bestehend aus einem 1-Hydroxymethylpyrrolizidin und aliphatischen Mono- und Dicarbonsäuren (Mattocks 1986). 1,2-ungesättigte PA/PANO wirken hepatotoxisch, mutagen und kanzerogen. Dabei haben die in Kreuzkräutern vorkommenden zyklischen Diestern das höchste akut toxische und kanzerogene Potential (Roeder 1992). Durch den Lebermetabolismus werden daraus hochreaktive Pyrrolester gebildet. Diese hochreaktiven Pyrrolester bilden DNA- und Protein-Addukte und sind verantwortlich für die toxische Wirkung der 1,2-ungesättigten PA/PANO (Mattocks 1986; Fu et al. 2007).

Ein Aspekt der PA/PANO-Problematik liegt darin, dass in Pflanzen stets viele unterschiedliche PA- und korrespondierende PANO-Strukturen parallel vorkommen und die Gemische sehr komplex sind (Teuscher & Lindequist 2010). Außerdem wird in Abhängigkeit der PA/PANO-Struktur eine unterschiedliche Toxizität angenommen (Merz & Schrenk 2016).

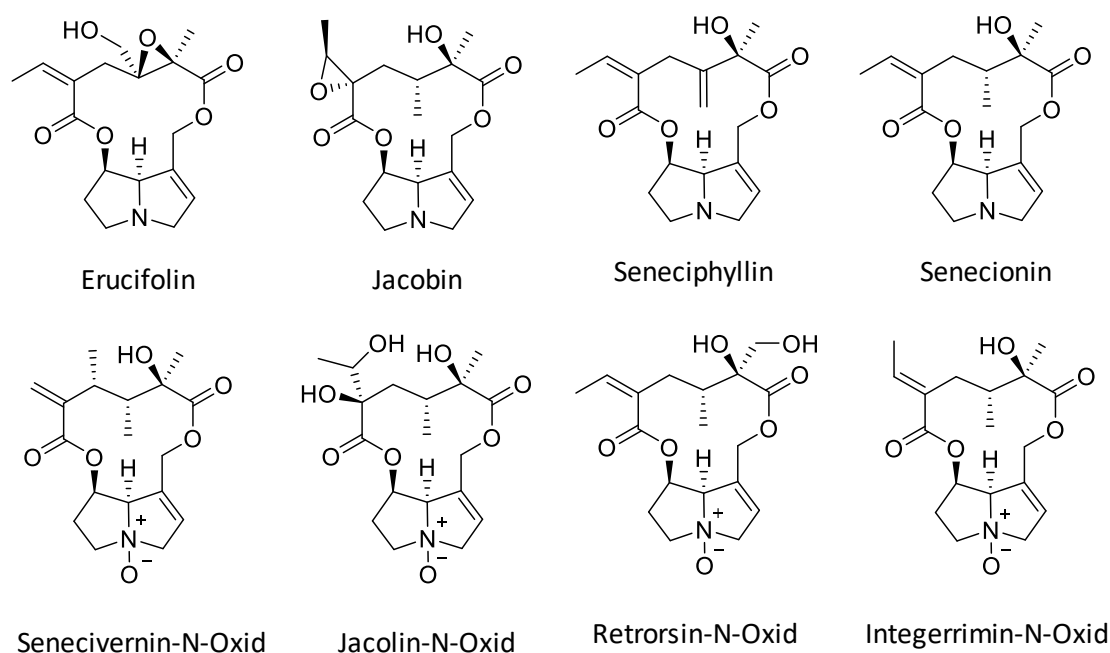


Abbildung 1: Typisches Spektrum an Pyrrolizidinalkaloiden (PA) und PA-N-Oxiden (PANO) aus *Senecio/Jacobaea*-Pflanzen (Teuscher & Lindequist 2010)

Es wird des Weiteren vermutet, dass es bei einer chronischen Exposition gegenüber PA/PANO nicht nur zu einer Schädigung der Leber, sondern auch zu einer Schädigung des Lungengewebes kommt. Dies hat die Entstehung einer pulmonal-arteriellen Hypertonie zur Folge, die selbst oft unerkannt bleibt und zu einem Rechtsherzversagen führen kann (Edgar et al. 2011).

Zur Risikobewertung einer PA/PANO-Exposition des Menschen stehen zwei Langzeit-Kanzerogenitätsstudien mit Ratten zur Verfügung, die mit zwei PA unterschiedlichen Strukturtyps, Riddelliin und Lasiocarpin, mit ähnlichen Wirkkonzentrationen und Endpunkten (Hämangiosarkome der Leber) durchgeführt wurden (NCI 1978, NTP 2003). Riddelliin ist ein typischer Vertreter von *Senecio*-PA. Diese Studie ist derzeit Grundlage zur Ableitung der Benchmark-Dosis (BMDL₁₀ von 0,237 mg/kg Körpergewicht) zur Bewertung genotoxischer Verbindungen. Auf Basis einer *Margin-of-Exposure* (MOE)-Bewertung gelten tägliche Aufnahmemengen von 0,024 µg/kg Körpergewicht als wenig bedenkliche Dosis für Krebsrisiken (Anwendung eines MOE von 10.000; EFSA 2017).

Akute Vergiftungen beim Menschen sind bisher überwiegend für Afghanistan, Indien und Pakistan dokumentiert. Der Ursprung war Getreide, welches mit Samen von *Crotalaria*- und *Heliotropium*-Arten kontaminiert war. Zuletzt wurden Fälle der für PA/PANO-Vergiftungen typischen Lebererkrankung, dem sogenannten hepatic sinusoidal obstruction syndrom (HSOS) aus den Jahren 2005 und 2008 berichtet (Kakar et al. 2010, Schneider et al. 2012). Hinsichtlich einer Akuttoxizität orientiert man sich gegenwärtig an Daten aus einer Studie mit Ratten zur hepatotoxischen Wirkung der PA (Auslösung des HSOS) (NTP 1992). Der abgeleitete gesundheitsbasierte Orientierungswert liegt bei 0,1 µg/kg Körpergewicht/Tag (BfR 2011). Im Sinne eines vorbeugenden Verbraucher- und Tierschutzes hat die Codex Alimentarius Kommission außerdem einen *Code of Practice* veröffentlicht, mit dem Ziel die PA/PANO-Kontamination in der Nahrungskette und schädliche Effekte auf Nutztiere zu minimieren (CCCF 2013).

Bei landwirtschaftlichen Nutztieren wird die Vergiftung mit PA/PANO als Seneciose oder Schweinsberger Krankheit bezeichnet und wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts in Deutschland, USA, Kanada und Neuseeland berichtet. Hooper et al. (1978) beschreiben, dass die Empfindlichkeit gegenüber den PA/PANO von Schaf und Ziege über das Rind zum Pferd hin ansteigt. Hühner und Schweine werden als die empfindlichsten Spezies benannt. Von Weidetieren werden PA/PANO-haltige Pflanzen nach Möglichkeit gemieden, solange andere Futterquellen verfügbar sind. Werden PA/PANO-haltige Pflanzen jedoch mit geerntet und in Heu, Silage oder Grascobs vermischt, können diese Fraßgifte von den Tieren nicht mehr wahrgenommen werden und werden mitgefressen (Petzinger, 2011a, 2011b). Welche PA/PANO-Gehalte in Futtermitteln aus Sicht des Verbraucherschutzes und der Gesundheit von Nutztieren als noch akzeptabel anzusehen sind, ist gegenwärtig mangels Daten kaum ableitbar. Die PA/PANO-Gehalte in Pflanzen können in Abhängigkeit von Saison und Schnitzeitpunkt stark variieren (Chizzola et al. 2015).

PA/PANO können infolge eines Transfers über Nutztiere aus Futtermitteln in tierische Produkte wie Milch, Käse, Eier und potenziell auch in Fleisch übergehen. Dieser Transfer ist abhängig von der Tierart und dem PA/PANO-Anteil bzw. -Zusammensetzung PA/PANO-haltiger Pflanzen im Futtermittel (EFSA 2011). In einer europaweiten Studie, bei der Lebensmittel tierischen Ursprungs auf PA/PANO untersucht wurden, zeigte sich, dass in 6% der 189 Milchproben PA/PANO nachweisbar waren (Mulder et al. 2015). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die untersuchten Milchproben aus dem Einzelhandel stammten. Bei diesen Milchproben ist von einer sehr hohen Verdünnung auszugehen, die durch die Vermischung von großen Milchmengen in Sammel tanks von verschiedenen Milcherzeugerbetrieben in Sammel tanks verursacht wird.

So kann es vorkommen, dass einzelne Milcherzeuger Milch mit sehr hohen PA/PANO-Gehalten liefern, die in der Molkerei mit unbelasteter bzw. gering belasteter Milch gemischt wird. Dies kann in Summe eine geringere PA/PANO-Belastung von Milch suggerieren, als sie im einzelnen Milchbetrieb tatsächlich vorherrscht. Das ist vor allem problematisch, da sich „Ab-Hof“ verkauften Produkte zunehmender Beliebtheit erfreuen und somit das Risiko im Einzelfall höher sein kann. Daten über die PA/PANO-Belastung von Milch aus Direktvermarktung stehen bisher noch nicht zur Verfügung, um ein mögliches Risiko bewerten zu können.

Bisher durchgeführte Studien zum Transfer von PA/PANO vom Futtermittel in die Milch von Kühen bzw. Ziegen zeigen, dass die Transferraten einzelner *Senecio*-PA/PANO zwischen 0,1 und 4 % liegen (Hoogenboom et al. 2011; Dickinson 1976).

Die Milch von kleinen Wiederkäuern (Schafe, Ziegen) wird häufig von Direktvermarktern ohne weiteres Vermischen mit Milch von anderen Milcherzeugern verarbeitet und in Form von Milchprodukten an den Verbraucher abgegeben. Erste Daten zur Stabilität von PA/PANO bei der Pasteurisierung und UHT-Behandlung von kontaminierter Kuhmilch sowie bei der Herstellung von Joghurt und Käse wurden publiziert (de Nijs et al. 2017). Dabei stand allerdings nur sehr wenig Probenmaterial zur Verfügung, sodass es nur möglich war Tendenzen abzuleiten. Es gab dabei Hinweise darauf, dass der PA/PANO-Gehalt durch fermentative Prozesse, z.B. bei der Joghurtherstellung und Käsereifung abnehmen könnte (de Nijs et al. 2017).

3. Material und Methoden

3.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse

3.1.1. Probennahme

Die Probennahme erfolgte in zwei Modellregionen, Bayern und Schleswig-Holstein. Insgesamt wurden 228 Milchproben gesammelt, davon 108 in Bayern und 120 Milchproben in Schleswig-Holstein. Alle 30 bayerischen und 28 von 63 schleswig-holsteinischen Milchviehbetrieben haben sich freiwillig an der Studie beteiligt (aktive Teilnahme). Die übrigen 35 Milchviehbetriebe aus Schleswig-Holstein wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und die Probenahme erfolgte an ihren Verkaufsstellen (passive Teilnahme). Die Milch wurde entweder direkt aus dem Milchsammeltank der Betriebe entnommen oder von Milchverkaufsstellen bezogen. Insgesamt wurde über einen Zeitraum von zwei Jahren Milchproben genommen, um mögliche saisonale Unterschiede zu berücksichtigen. Die bayerischen Milchproben wurden von denselben 30 Milchviehbetrieben in drei oder vier aufeinanderfolgenden Saisons (A-D) ab März 2020 (A) bzw. Juli 2020 (B) entnommen (Tabelle 2). Milchproben aus Schleswig-Holstein wurden von denselben 35 Milchviehbetrieben in zwei aufeinanderfolgenden Saisons ab September 2020 (mit B-C bezeichnet) und von 28 verschiedenen Milchviehbetrieben in zwei aufeinanderfolgenden Saisons ab August 2021 (mit D-E bezeichnet) genommen. Bei sechs Milchviehbetrieben aus Schleswig-Holstein wurde die Beprobung nur in der jeweils ersten Beprobungsperiode durchgeführt (B oder D). Die gezogenen Milchproben wurden nach der Probennahme während des Transports gekühlt und anschließend bis zur PA/PANO-Analyse eingefroren (-20°C) (Klein et al. 2024).

Tabelle 2: Übersicht über alle gezogenen Milchproben von Höfen in Schleswig-Holstein und Bayern, während der aufeinanderfolgenden Saisons (Bezeichnungen A bis E). Die Daten wurden von Klein et al. veröffentlicht (Klein et al. 2024).

Region	Saison ^a	Anzahl beprobter Höfe	Anzahl Höfe Direkt-vermarktung ^c	Anzahl Proben	Anzahl Proben ökologisch
Bayern	A	18	2	18	11
	B	30	5	30	17
	C	30	5	30	17
	D	30	6	30	17
	Summe	30	6	108	62
Schleswig - Holstein	B	35	11	35	18
	C	33	11	33	17
	D	28	28	28	9
	E	24	24	24	7
	Summe	63	39	120	51

^a A, Winter/Frühling 2020; B, Sommer/Herbst 2020; C, Winter/Frühling 2021; D, Sommer/Herbst 2021; E, Winter/Frühling 2022.

3.1.2. Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden und -N-Oxiden in den Milchproben

3.1.2.1. Referenzstandards und Chemikalien

Referenzstandards

Die verwendeten Referenzstandards mit Bezugsquellen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Es wurden einzelne Standardlösungen der Konzentration 1 mg/mL erstellt. Indicin und Indicin-*N*-Oxid wurden in Acetonitril gelöst, 7-O-Acetylintermedin, 7-O-Acetylintermedin-*N*-Oxid, 7-O-Acetyllycopsamin, 7-O-Acetyl-lycopsamin-*N*-Oxid, Sceleratin, Sceleratin-*N*-Oxid, Merepoxin und Merepoxin-*N*-Oxid in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (50/50, v/v). Die übrigen Referenzstandards wurden in Methanol gelöst. Es wurde ein Standard-Mix aus mit Methanol verdünnten Aliquoten der einzelnen Standardlösungen hergestellt. Alle Lösungen wurden unter Lichtausschluss bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Referenzstandards und deren Bezugsquelle

Bezugsquelle	Referenzstandards
CFM Oskar Tropitzsch (Marktrechwitz, Germany)	7-O-Acetyllycopsamin- <i>N</i> -Oxid, Echinatin, Echinatin- <i>N</i> -Oxid, Heliosupin, Heliosupin- <i>N</i> -Oxid, Indicin, Indicin- <i>N</i> -Oxid, Integerrimin, Integerrimin- <i>N</i> -oxid, Jacolin, Jacolin- <i>N</i> -Oxid, Jaconin, Merenskin, Merenskin- <i>N</i> -Oxid, Merepoxin, Merepoxin- <i>N</i> -Oxid, Riddelliin, Riddelliin- <i>N</i> -Oxid, Rinderin, Rinderin- <i>N</i> -Oxid, Spartioidin, Sceleratin, Sceleratin- <i>N</i> -Oxid, Usaramin und Usaramin- <i>N</i> -Oxid
PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Germany)	7-O-Acetylintermedin, 7-O-Acetylintermedin- <i>N</i> -Oxid , 7-O-Acetyllycopsamin, Echimidin, Echimidin- <i>N</i> -Oxid, Erucifolin, Erucifolin- <i>N</i> -Oxid, Europin, Europin- <i>N</i> -Oxid, Heliotrin, Heliotrin- <i>N</i> -Oxid, Intermedin, Intermedin- <i>N</i> -Oxid, Jacobin, Jacobin- <i>N</i> -Oxid, Lasiocarpin, Lasiocarpin- <i>N</i> -Oxid, Lycopsamin, Lycopsamin- <i>N</i> -Oxid, Monocrotalin, Monocrotalin- <i>N</i> -Oxid, Retrorsin, Retrorsin- <i>N</i> -Oxid, Senecionin, Senecionin- <i>N</i> -Oxid, Seneciphyllin, Seneciphyllin- <i>N</i> -Oxid, Senecivernin, Senecivernin- <i>N</i> -Oxid, Senkirkin und Trichodesmin

Chemikalien

Für die Probenanalysen wurden Acetonitril (LC-MS grade), 25%ige Ammoniaklösung (analytical grade), n-Hexan (analytical grade) und Methanol (LC-MS grade) von Th. Geyer (Renningen, Deutschland) verwendet. Ammoniumcarbonat (HPLC-grade) und 25%ige Ammoniaklösung (LC-MS grade), die als Additive für die Fließmittel der LC-MS/MS Messungen verwendet wurden, wurden von Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) bzw. Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben. Das Reinstwasser wurde durch das Wasserreinigungssystem UltraClear™ TP UV UF TM von Evoqua Water Technologies (Barsbüttel, Germany) erhalten.

3.1.2.2. Probenvorbereitung

Die Milchproben wurden mit der entwickelten Methode zur Bestimmung von PA/PANO in Milch, die auch für die Milchanalysen der Transferstudien (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I) verwendet wurde, untersucht (Klein et al. 2022). Die aufgetaute Milchprobe wurde in ein 50-mL-Zentrifugenröhrchen gegeben. Das eingesetzte Probenvolumen lag bei 3 mL. Es folgte eine 30-minütige Flüssig-Flüssig-Extraktion mit 15 mL n-Hexan und 30 mL 2 %iger wässriger Ameisensäure mittels Horizontalschüttler (450 U/min) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde zentrifugiert ($2600 \times g$, 15 min, 20 °C) und die wässrige Phase in ein neues 50-mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Die wässrige Phase wurde zur Festphasenextraktion eingesetzt. Dazu wurden Bond Elut Plexa PCX 200 mg-Kartuschen (Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die Kartusche wurde mit 5 mL Methanol und 5 mL 2 %iger wässriger Ameisensäure aktiviert bzw. konditioniert und die Kartusche mit 15 mL der wässrigen Phase des Probenextrakts beladen. Es wurde mit 10 mL Wasser und 10 mL Methanol gewaschen. Die Analyten wurden mit 6 mL ammoniakhaltigem Methanol (5 %) in ein Glasfläschchen eluiert und das Eluat anschließend in einem Wasserbad bei 50 °C unter Stickstoffstrom abgedampft. Der Rückstand wurde in 500 µL eines Methanol/Wasser-Gemisches (10/90, v/v), durch Schütteln und Ultraschallbehandlung für 30 Sekunden, gelöst. Die Lösung wurde in ein Messgefäß filtriert (Spritzenfiltration, 0,2 µm, Polyvinylidenfluorid PVDF) (Klein et al. 2022; Klein et al. 2024).

Ein Analyt galt als vorhanden, wenn das Ionenverhältnis ($\pm 20 \%$) und die Retentionszeit ($\pm 0,10$ min) der Peaks in beiden Probenwiederholungen mit den Massenübergängen für Quantifier und Qualifier der Kalibrierstandards übereinstimmten. PA/PANO wurden mittels externer Matrix-Kalibrierungskurve (0-2,5 µg/L in der Messlösung) quantifiziert. Für die Erstellung der externen Matrix-Kalibrierung wurde Blindmatrix, Milch in der keine PA/PANO nachweisbar waren, verwendet. Die Kalibrierstandards wurden jeweils vor und nach einer Messsequenz von Proben gemessen (Klein et al. 2022; Klein et al. 2024).

Wenn der Gehalt an einzelnen PA/PANO den Bereich der Kalibrierungskurve überschritt, wurden die Probenlösungen verdünnt (1+2 mit Methanol/Wasser (10/90, v/v)) und mit Kalibrierungsstandards in entsprechend verdünnter Blindmatrix analysiert. Jede Milchprobe wurde als Doppelbestimmung aufgearbeitet und analysiert. Alle Ergebnisse sind nicht wiederfindungskorrigiert. Zur Berechnung der PA/PANO-Gesamtgehalte wurden einzelne Analyten, deren berechnete Konzentration unter der Nachweisgrenze (LOD) lag, mit 0,0 µg/L einbezogen. Bei einer berechneten Konzentration zwischen LOD und der Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde die Konzentration in der Probe als 0,5*LOQ festgelegt. Die Linearität der LC-MS/MS-Methode war für alle untersuchten PA/PANO $R^2 > 0,993$. Die individuellen LOD- und LOQ-Werte der Methode, die mit dem Kalibrierungsansatz nach DIN 32645 bestimmt wurden, lagen zwischen 0,005 und 0,054 µg/L bzw. zwischen 0,009 und 0,123 µg/L. Sie sind in Tabelle 4 aufgeführt (Klein et al. 2022; Klein et al. 2024).

3.1.2.3. Probenmessung

Die Messungen der Proben- und Kalibrierlösungen erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelter Triplequadrupol-Massenspektrometrie (MS/MS). Dazu wurde ein Shimadzu Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (LC-20AB, DGU-405, SIL-20AC HT, CTO-20AC, CBM-20A, Duisburg, Deutschland) und ein API4000-Triplequadrupol-Massenspektrometer (Sciex, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Analyten wurden durch Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus ionisiert. Die Temperatur des Säulenofens der LC war auf 30 °C eingestellt und das Injektionsvolumen betrug 10 µL. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer 100 × 2,1 mm Kinetex™ 2,6 µm EVO C18 100 Å Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), mit passender Vorsäule (SecurityGuard™ ULTRA EVO C18 2,1 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Reinstwasser mit Ammoniumcarbonat als Additiv (10 mM) mit einem pH von 9,0 (A) und Acetonitril (B) wurden als mobile Phasen verwendet (Klein et al. 2022).

Die binären Gradientenbedingungen waren: 0,0 min 0,0 % B, 0,2 min 5,0 % B, 6,0 min 10,0 % B, 19,0 min 28,6 % B, 22,8 min 34,0 % B, 23,3 min 90,0 % B, 24,8 min 90,0 % B and 25,8 min 0,0 % B. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min. Die Säule wurde vor jedem Lauf 7,0 min lang mit den Startbedingungen äquilibriert (Klein et al. 2024). Als Software für die Datenerfassung und -verarbeitung wurden die Programme Analyst (Version 1.6.2, Sciex) und MultiQuant (Version 3.0.1, Sciex) verwendet.

Tabelle 4: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) der einzelnen Analyten (Klein et al. 2022).
Alle Werte sind angegeben als Konzentration [µg/L] in der Milch.

Pyrrolizidinalkaloid/ Pyrrolizidinalkaloid-<i>N</i>-Oxid	LOD [µg/L]	LOQ [µg/L]
7-O-Acetylintermedin	0,007	0,009
7-O-Acetyllycopsamin	0,007	0,020
Erucifolin	0,009	0,009
Erucifolin- <i>N</i> -Oxid	0,012	0,036
Echimidin	0,011	0,026
Echimidin- <i>N</i> -Oxid	0,008	0,018
Echinatin	0,007	0,019
Echinatin- <i>N</i> -Oxid / Rinderin- <i>N</i> -Oxid	0,019	0,033
Europin	0,007	0,021
Europin- <i>N</i> -Oxid	0,008	0,025
Heliosupin	0,010	0,026
Heliosupin- <i>N</i> -Oxid	0,008	0,023
Heliotrin	0,007	0,021
Heliotrin- <i>N</i> -Oxid	0,009	0,012
Indicin /Intermedin	0,007	0,019
Indicin- <i>N</i> -Oxid/ Lycopsamin- <i>N</i> -Oxid	0,015	0,030
Integerrimin	0,012	0,030
Integerrimin- <i>N</i> -Oxid	0,022	0,027
Intermedin- <i>N</i> -Oxid	0,006	0,015
Jacobin	0,017	0,039
Jacobin- <i>N</i> -Oxid	0,007	0,019
Jacolin	0,023	0,056
Jacolin- <i>N</i> -Oxid	0,011	0,022
Jaconin	0,023	0,036
Lasiocarpin	0,015	0,043
Lasiocarpin- <i>N</i> -Oxid	0,010	0,021
Lycopsamin	0,010	0,016
Monocrotalin	0,013	0,040
Monocrotalin- <i>N</i> -Oxid	0,010	0,016
Merenskin	0,020	0,044
Merenskin- <i>N</i> -Oxid	0,013	0,101
Merepoxin	0,039	0,123
Merepoxin- <i>N</i> -Oxid	0,012	0,037
Riddelliin	0,011	0,038
Riddelliin- <i>N</i> -Oxid	0,010	0,025
Rinderin	0,005	0,014
Retrorsin	0,012	0,039
Retrorsin- <i>N</i> -Oxid	0,013	0,016
Senecionin	0,008	0,015
Senecionin- <i>N</i> -Oxid	0,017	0,039

Tabelle 4: Fortsetzung

Pyrrolizidinalkaloid/ Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxid	LOD [µg/L]	LOQ [µg/L]
Spartioidin	0,040	0,040
Senkirkin	0,011	0,034
Sceleratin	0,054	0,054
Sceleratin-N-Oxid	0,047	0,047
Seneciphyllin	0,011	0,032
Seneciphyllin-N-Oxid	0,032	0,032
Senecivernin	0,009	0,019
Senecivernin-N-Oxid	0,022	0,022
Trichodesmin	0,041	0,041
Usaramin	0,011	0,034
Usaramin-N-Oxid	0,009	0,028

3.2. Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten

3.2.1. Herstellung von Milchprodukten (MRI)

Für die Untersuchung des Verhaltens von PA/PANO während der Verarbeitung von Milch zu den Milchprodukten Käse und Joghurt, wurde jeweils natürlich mit PA/PANO belastete Milch aus den Transferstudien (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I) sowie künstlich kontaminierte Milch zu typischen Produkten verarbeitet. Dabei wurden über die gesamte Herstellung und Reifung hinweg Proben gezogen und auf PA/PANO analysiert.

3.2.1.1. Herstellung von natürlich kontaminierten Milchprodukten aus Milchen der Transferstudien

Das Verhalten von PA/PANO wurde bei der Herstellung von Milchprodukten (Flüssigmilch, Käse, Joghurt) aus kontaminierter Milch untersucht. Aus der Milch der Transferstudien wurden marktrelevante und für die jeweilige Milchart typische Produkte hergestellt: aus Kuhmilch Joghurt und Schnittkäse Typ Edamer, aus Schafmilch Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego, und aus Ziegenmilch Joghurt und Schnittkäse Typ Picodon.

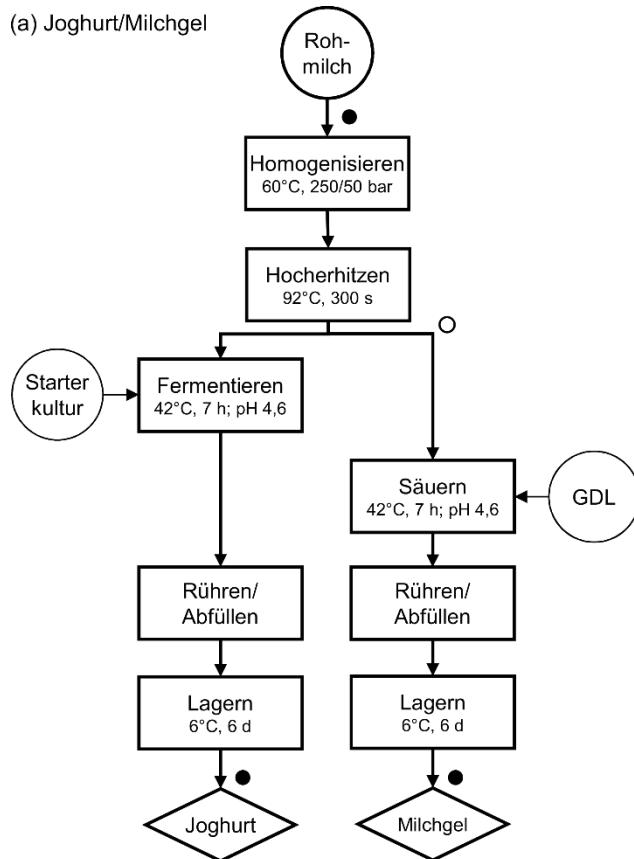
Die Herstellung erfolgte im Molkereitechnikum des Max Rubner-Instituts, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch (MRI-MF) am Standort Kiel im kleinen, handwerklichen Maßstab, um auch geringe Milchmengen den Temperatur-Zeit-Bedingungen und Veränderungen durch die notwendigen Prozessschritte auszusetzen. Es erfolgte keine Standardisierung mit anderer Milch oder Milchpulver, um die Massenbilanz und PA/PANO-Gehalte nicht zu verfälschen. Diese Proben sind repräsentativ für diverse Erhitzungsverfahren, Fermentation und mikrobielle Veränderungen aufgrund der Reifung und Lagerung der Produkte bis zum Verzehr. Für Joghurt wurde, neben dem mikrobiellen, ein chemisch gesäuertes Milchgel hergestellt, um mikrobielle Einflüsse auf den PA/PANO-Gehalt von den Effekten der Säuerung unterscheiden zu können.

Die Transferstudie mit Kühen fand am FLI in Braunschweig statt. Die tagesfrische Rohmilch wurde mittels Kurier von Braunschweig zum MRI-Standort Kiel transportiert. Aus Kuhmilch wurden sowohl fermentierte Milchprodukte als auch der Schnittkäse Typ Edamer hergestellt. Pro Wiederholung wurden 160 L Rohmilch verarbeitet und entsprechend (hoch-)erhitzt, fermentiert, verkäst und anschließend gereift. In Abbildung 2 sind alle Temperatur-Zeit-Kombinationen während der Milchbehandlung in Form eines Verfahrensschemas angegebenen, ebenso wie die Probenahmepunkte für die anschließende Analyse der PA/PANO-Gehalte, der produkttypischen Inhaltsstoffe und der physikalischen Parameter der Milchprodukte. Es wurden jeweils drei Wiederholungen mit Rohmilch aus der Transferstudie durchgeführt.

Als Starterkultur für das fermentierte Milchprodukt Joghurt wurde eine Mehrstammkultur (Lyofast SYAB 1, Sacco, Cadarago, Italien) verwendet. Dabei handelt es sich um eine komplexe Starterkultur mit probiotischem Effekt und -Bildung extrazellulärer polymerer Substanzen, die neben den Milchsäurebildern *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* auch *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* enthält.

Die Transferstudie mit Ziegen und Schafen wurde von der Versuchsstation Schädtebek des MRI-MF durchgeführt, von der ein täglicher Transport von Proben und Milch zur Weiterverarbeitung an den MRI-Standort Kiel stattfand. Aus Ziegenmilch wurden sowohl fermentierte Milchprodukte als auch der Schnittkäse Typ Picodon hergestellt (Abbildung 3). Für die drei Wiederholung wurden je 40 L Rohmilch verarbeitet und entsprechend erhitzt, fermentiert, verkäst und anschließend gelagert. Aus Schafmilch wurden die Weich- und Hartkäse Typ Feta bzw. Typ Manchego hergestellt (Abbildung 4). Dafür wurden jeweils 22 L Rohmilch für drei Wiederholungen verarbeitet.

(a) Joghurt/Milchgel



(b) Edamer

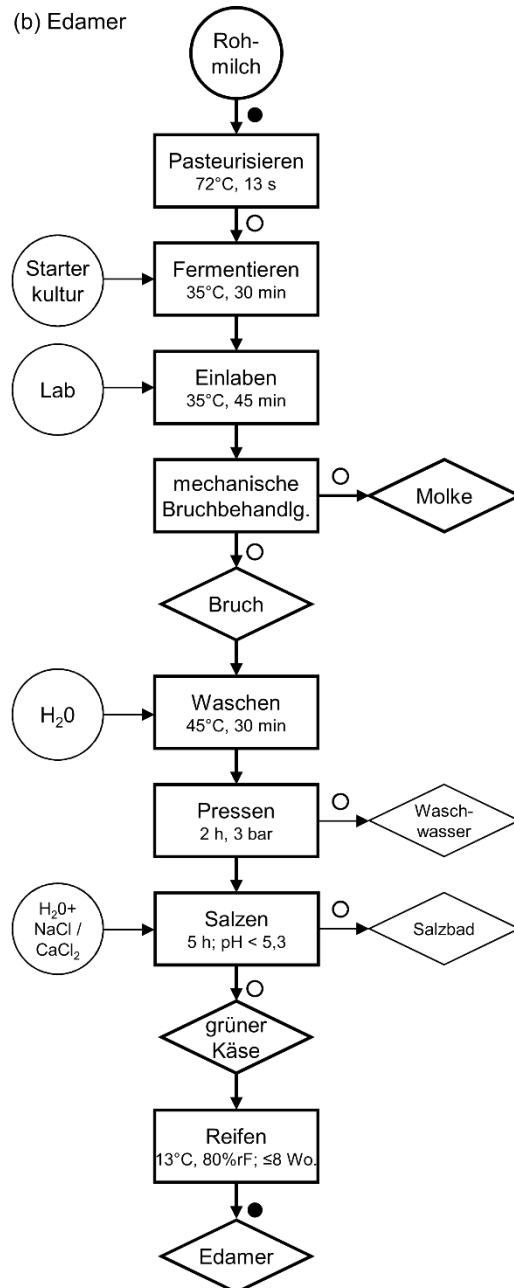


Abbildung 2: Verfahrensschema und Prozessparameter zur Herstellung von (a) Rührjoghurt bzw. Milchgel und (b) Schnittkäse Typ Edamer aus Kuhmilch; Kreis (alle): Probenahmepunkte zur Analyse der PA/PANO-Gehalte und von prozessbegleitenden Parametern, Kreis (gefüllt): Daten zu bestimmten Milchinhaltsstoffen und Produktparametern sind dargestellt in 4.2.2. (Tabelle 9 und 10); GDL: Glucono-delta-lacton zur chemischen Säuerung von hoherhitzter Joghurtmilch

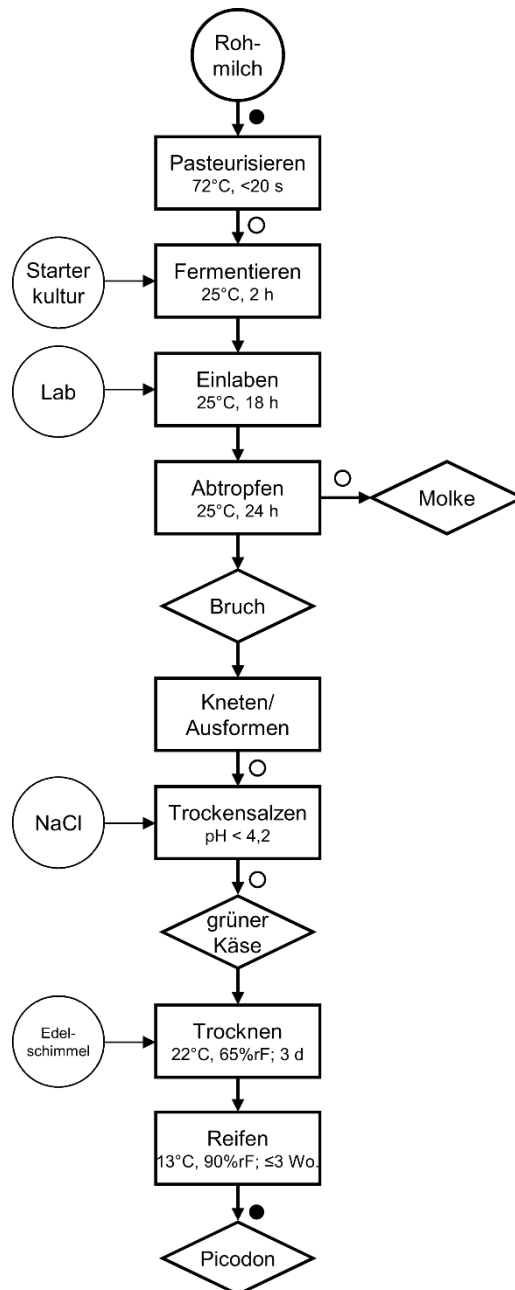


Abbildung 3: Verfahrensschema und Prozessparameter zur Herstellung von Weichkäse Typ Picodon aus Ziegenmilch; Kreis (alle): Probenahmepunkte zur Analyse der PA/PANO-Gehalte und von prozessbegleitenden Parametern, Kreis (gefüllt): Daten zu bestimmten Milchinhaltsstoffen und Produktparametern sind dargestellt in 4.2.2. (Tabelle 9 und 10)

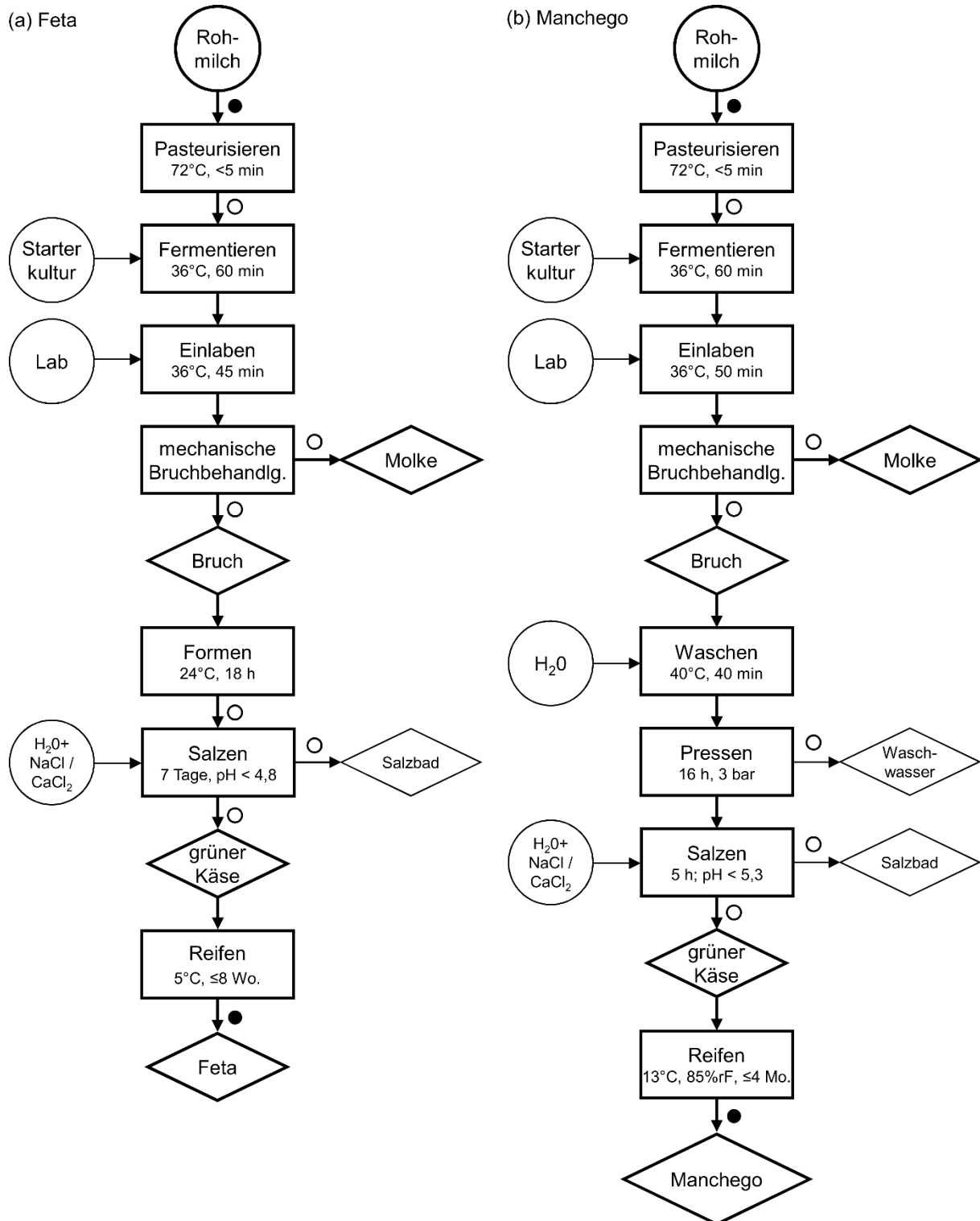


Abbildung 4: Verfahrensschema und Prozessparameter zur Herstellung von (a) Weichkäse Typ Feta und (b) Hartkäse Typ Manchego aus Schafmilch; Kreis (alle): Probenahmepunkte zur Analyse der PA/PANO-Gehalte und von prozessbegleitenden Parametern, Kreis (gefüllt): Daten zu bestimmten Milchinhaltsstoffen und Produktparametern sind dargestellt in 4.2.2. (Tabelle 9 und 10)

3.2.1.2. Herstellung von Milchprodukten aus künstlich kontaminierter Milch

Für die Herstellung von Milchprodukten (Käse, Joghurt) aus künstlich kontaminierter Milch, wurde unbelastete Milch mit einem PA/PANO-Gemisch (Tabelle 5) dotiert. Die Herstellung der Produkte erfolgte analog zu den Versuchen mit der Milch aus den Transferstudien (3.3.1.1). Unbelastete Kuhmilch wurde von der Versuchsstation Schädtkbek zur Verfügung gestellt. Unbelastete Ziegen- und Schafmilch wurde von Bioland-Betrieben aus dem Umland von Kiel bezogen. Es wurden vier Wiederholungen mit künstlich kontaminierter Milch (drei Wiederholungen analog zu 3.3.1.1 plus ein Blindversuch) durchgeführt.

Für die künstliche Kontamination der Kuh-, Schafs-, Ziegenmilch wurden 10 PA und ein PANO aufgrund ihrer Struktur und botanischen Herkunft ausgewählt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ausgewählte PA/PANO für die künstliche Kontamination von Milch zur Herstellung von Milchprodukten aufgelistet nach botanischer Herkunft

Pflanzenfamilie	PA/PANO
Asteraceae (Gattung <i>Senecio/Jacobaea</i>)	Jacolin, Jacobin, Erucifolin, Retrorsin, Senecionin-N-Oxid, Senkirkin
Boraginaceae	Echimidin, Lycopsamin, Lasiocarpin, Heliotrin
Leguminosae	Monocrotalin

Echimidin, Erucifolin, Heliotrin, Jacobin, Lasiocarpin, Lycopsamin, Monocrotalin, Retrorsin, Senecionin-N-Oxid und Senkirkin wurden von Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland) und Jacolin von CFM Oskar Tropitzsch GmbH (Marktrechwitz, Deutschland) bezogen. Alle Substanzen wurden in Methanol gelöst und Mischlösungen für die Dotierung der Milch der künstlich kontaminierten Milchprodukte hergestellt. Die notwendigen PA/PANO-Konzentrationen wurden anhand von Literaturdaten (Nijs et al. 2017), den aufgeführten Daten im Abschlussbericht zu Arbeitspaket I (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I) und den bei der Herstellung eingesetzten Volumina an Milch (3.2.1.1.) berechnet. Der Zielkonzentrationsbereich war 30 µg/kg je PA/PANO für die Produkte Joghurt, Schnittkäse Typ Edamer, Weichkäse Typ Picodon und Weichkäse Typ Feta und 66,7 µg/kg für den Hartkäse Typ Manchego. Das Volumen der Dotierlösungen betrug 2 mL. Im Fall des Schnittkäses Typ Edamer betrug das finale Volumen 4 mL.

Zusätzlich wurde eine Mischlösung aller elf PA/PANO mit einer Konzentration von 100 µg/mL je PA/PANO hergestellt, die als Stammlösung für die Standardlösung der anschließenden PA/PANO-Analysen der Probensets der künstlich kontaminierten Milchprodukte diente.

3.2.2. Bestimmung der Milchinhaltsstoffe und Produktparameter (MRI)

Aus allen relevanten Prozessschritten, deren Nebenströmen und über die Reifung der Produkte hinweg wurden Proben für die technologiebegleitende Analytik der Inhaltsstoffe und PA/PANO-Gehalte gezogen. In flüssigen Milchproben, wie Rohmilch, pasteurisierter Kesselmilch und hocherhitzte Joghurtmilch, wurden mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) die Trockenmasse, der Fett- und der Proteinanteil bestimmt (ISO 9622 2013). Chemische und physikalische Analysenmethoden aus dem Methodenbuch des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) (VDLUFA 2010) zur begleitenden Bewertung der Inhaltstoffe wurden an die Matrices Joghurt, Weich-, Schnitt- und Hartkäse angepasst. Die Trockenmasse für halbfeste und pastöse Proben wurde mit Methode C35.4 bestimmt. Deren Fettanteil wurde gemäß C15.3.2 und der Proteinanteil nach Dumas gemäß C30.2 analysiert. Für flüssige Proben wurden der pH- und SH-Wert nach den Methode C8.2 bzw. C8.3 bestimmt.

3.2.3. PA/PANO-Analytik

3.2.3.1. PA/PANO-Analytik von Joghurt und Schnittkäse Typ Edamer aus natürlich und künstlich kontaminierter Kuhmilch

Referenzstandards

Zur Herstellung der Standardlösungen zur Bestimmung des PA/PANO-Gehalts in den Proben, welche aus natürlich kontaminierter Kuhmilch hergestellt wurde, wurde der in 3.1.2.1 beschriebene PA/PANO-Standard verwendet. Die Standardlösungen zur Bestimmung des PA/PANO-Gehalts in den Proben, welche aus künstlich kontaminierter Kuhmilch hergestellt wurde, wurde der in 3.2.1.2. verwendet.

Probenaufarbeitung für das Probenset Joghurt aus Kuhmilch

Die Proben des Probensets Joghurt aus Kuhmilch (Rohmilch, hocherhitzte Joghurtmilch, Joghurt, Milchgel) wurden mittels der in 3.1.2.2. beschriebenen Methodik für die Bestimmung des PA/PANO-Gehalts vorbereitet. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung aufgearbeitet.

Probenaufarbeitung für das Probenset Schnittkäse Typ Edamer aus Kuhmilch

Alle Proben des Edamer Sets, mit Ausnahme der Proben des Salzbad, wurden mittels der in 3.1.2.2. beschriebenen Methodik für die Bestimmung des PA/PANO-Gehalts vorbereitet. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung aufgearbeitet.

Für die Proben des Salzbadess wurde die Aufarbeitungsmethode in Anlehnung an Mulder et al. 2015 verwendet. Die Proben wurden im Wasserbad bei 30 °C aufgetaut und durch Schütteln homogenisiert und in Doppelbestimmung aufgearbeitet. Hierfür wurden jeweils 3 mL der Probe in einem 50-mL-Zentrifugenröhrchen mit 30 mL 0,2 %ige Ameisensäure und 15 mL *n*-Hexan mittels Horizontalschüttler (500 U/min) für 30 min extrahiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 20 °C, 2600 × *g*) wurden 20 mL der wässrigen Phase in ein weiteres 50-mL-Zentrifugenröhrchen überführt und der pH-Wert durch Zugabe von NH₃ (25 %, p. A.) auf 9-10 eingestellt. Der pH-Wert wurde mittels pH-Teststreifen (Chemsolute®, pH 7,5-14, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland) überprüft und die wässrige Phase erneut zentrifugiert (15 min, 20 °C, 3600 × *g*). Anschließend wurde die wässrige Phase mittels Festphasenextraktion gereinigt. Hierfür wurden Polymeric Reversed Phase-Kartuschen (Strata™-X 33 µm, 200 mg Bettmasse/6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) zunächst mit 6 mL Methanol und 6 mL wässriges NH₃ (0,1 %, v/v) konditioniert. 15 mL der wässrigen Phase wurde aufgetragen und die Kartuschen mit 6 mL wässrigen NH₃ (0,1 %, v/v) gewaschen und anschließend 5 min unter Vakuum getrocknet. Die Probe wurde mit 6 mL Methanol eluiert und das Eluat im Anschluss unter N₂-Strom im Wasserbad bei 50 °C bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 500 µL 10 % Methanol/Wasser (v,v) aufgenommen und 10 s mit dem Laborschüttler behandelt. Anschließend wurde die Lösung membranfiltriert (0,2 µm, PVDF, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

PA/PANO-Bestimmung und Datenauswertung

Die Messlösungen wurden mittels der in 3.1.2.3. beschriebenen LC-MS/MS-Methode analysiert. Die Bestimmung des PA/PANO-Gehalts erfolgte mit Hilfe von PA/PANO-Standardlösungen in der jeweiligen Blindwertmatrix. Für die Bestimmung des PA/PANO-Gehalts in den Proben, welche aus natürlich kontaminierter Kuhmilch hergestellt wurden, wurden PA/PANO-Standardlösungen, welche alle 54 PA/PANO enthielten, im Konzentrationsbereich von 0,1 -5,5 µg/L im Probenmaterial verwendet. Für die Bestimmung des PA/PANO-Gehalts in den Proben, welche aus künstlich kontaminierter Kuhmilch hergestellt wurden, wurden PA/PANO-Standardlösungen, welche aus dem PA/PANO-Standard, der in die Milch dotiert wurde, analog verwendet 3.2.1.2.. In diesem Fall wurden zusätzlich PA/PANO-Standardlösungen in 10 % Methanol/Wasser (v,v), welche alle 54 PA/PANO enthielten, mitgeführt, um eine Anwesenheit von weiteren nicht zu dotierten PA/PANO ggf. festzustellen. Wurde in den Messlösungen der Proben ein Gehalt der PA/PANO über der Konzentration der höchsten PA/PANO-Standardlösung ermittelt, so wurden die Messlösungen der Proben entsprechend mit 10 % Methanol/Wasser (v,v) verdünnt und der PA/PANO-Gehalt mittels PA/PANO-Standardlösung in der entsprechenden äquivalent verdünnten Blindwertmatrix bestimmt.

Für die weitere Datenauswertung wurden die Messwerte der zweifachen Probenaufarbeitung einer Probe gemittelt. Lag ein Gehalt der Doppelbestimmung unterhalb des im Rahmen der Validierung festgesetzten LOQ (4.2.3.1., Tabellen 11 und 12) wurde der Gehalt der Probe für die nachfolgenden Berechnungen als 0 µg/kg bzw. 0 µg/L gewertet. Die Ergebnisse wurden nicht um die Wiederfindungsraten korrigiert. Um den relativen Anteil am Gehalt bezogen auf den jeweiligen Gehalt in der Ausgangsmilch (hocherhitzte Joghurtmilch bzw. pasteurisierte Kesselmilch) zu ermitteln, wurde der Gehalt der Probe auf den korrespondierenden ermittelten Gehalt der Ausgangsmilch der jeweiligen Charge bezogen. Die relativen Anteile am Gehalt bezogen auf den Gehalt der jeweiligen Ausgangsmilch wurden im Anschluss über die drei Chargen gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Die Datenerfassung und -verarbeitung erfolgte mittels Analyst-Software (Version 1.6.2, Sciex) und MultiQuant-Software (Version 3.0.1, Sciex). Die verarbeiteten Daten wurden mit Microsoft Excel (Version 2019, Microsoft), OriginPro (Version 2020, Origin Lab) oder R Studio (Version 2023.03.1, R Version 4.3.0, tidyverse package (Wickham et al., 2019)) weiter analysiert.

3.2.3.2. PA/PANO-Analytik von Joghurt und Käse aus natürlich und künstlich kontaminierter Schaf- und Ziegenmilch

Referenzstandards

Zur Herstellung der Standardlösungen zur Bestimmung des PA/PANO-Gehalts in den Proben, welche aus natürlich kontaminierter Ziegen- oder Schafsmilch hergestellt wurden, wurde der in 3.1.2.1. beschriebene PA/PANO-Standard verwendet. Die Standardlösungen zur Bestimmung des PA/PANO-Gehalts in den Proben, welche aus künstlich kontaminierter Ziegen- und Schafsmilch hergestellt wurden, wird im Folgenden beschrieben.

Für die PA/PANO-Analytik der Proben (Herstellung aus künstlich kontaminierter Milch) wurde die in 3.2.1.2. beschriebene PA/PANO-Standardlösung um die jeweils korrespondierenden PA bzw. PANO ergänzt, um einen möglichen Umbau vom PA zum PANO bzw. vom PANO zum PA besser charakterisieren zu können.

Somit wurden die folgenden PA/PANO mittels der in 3.1.2.1. beschriebenen Einzellösungen zur Standardmischung zugegeben: Echimidin-*N*-Oxid, Erucifolin-*N*-Oxid, Heliotrin-*N*-Oxid, Jacobin-*N*-Oxid, Jacolin-*N*-Oxid, Lasiocarpin-*N*-Oxid, Lycopsamin-*N*-Oxid, Monocrotalin-*N*-Oxid, Retrorsin-*N*-Oxid, Senecionin. Die PA/PANO-Standardlösung, die als Stammlösung für die Bestimmung von PA/PANO in den Proben, die aus künstlich kontaminierter Ziegen- und Schafsmilch hergestellt wurden, bestand somit aus insgesamt 21 PA/PANO (Konzentration je Analyt: 5 µg/mL in Methanol).

Probenaufarbeitung für das Probenset Joghurt aus Ziegenmilch

Die Probenaufarbeitung für das Probenset Joghurt aus Ziegenmilch (Rohmilch, hocherhitzte Joghurtmilch, Joghurt, Milchgel) basierte auf der Probenaufarbeitung für das Probenset Joghurt aus Kuhmilch. Die Probenaufarbeitung wurde geringfügig angepasst, da die Ziegen in der Transferstudie höhere Extrakt-Dosierungen erhalten hatten und somit die Milch für die Joghurtherstellung höhere PA/PANO-Gehalte aufwies. Zudem wurde durch die Ergebnisse des Probensets Joghurt aus Kuhmilch deutlich, dass auch für die künstlich kontaminierten Proben eine geringere Konzentrierung möglich ist. Das eingesetzte Probevolumen wurde von 3 mL auf 2 mL und das Volumen der 2 %igen wässrigen Ameisensäure bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion entsprechend von 30 mL auf 25 mL reduziert. Die Zentrifugationsparameter wurden von 15 min bei 20 °C bei 2600 × *g* auf 15 min bei 20 °C bei 3600 × *g* erhöht. Des Weiteren wurde das Volumen des Methanol/Wasser-Gemisches bei der Rekonstitution von 500 µL auf 1000 µL verdoppelt.

Probenaufarbeitung für die Probensets des Weichkäse Typ Picodon, Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego aus Ziegen- bzw. Schafsmilch

Für die Nachverfolgung der PA/PANO während des Herstellungs- und Reifeprozesses der Milchprodukte aus Ziegen- und Schafsmilch wurden, die in Tabelle 6 aufgeführten Probenmaterialien analysiert.

Tabelle 6: Analytierte Probenmaterialien der unterschiedlichen Milchprodukte-Sets aus Ziegen- und Schafsmilch

Weichkäse Typ Picodon aus Ziegenmilch	Weichkäse Typ Feta aus Schafmilch	Hartkäse Typ Manchego aus Schafmilch
Rohmilch	Rohmilch	Rohmilch
Pasteurisierte Kesselmilch	Pasteurisierte Kesselmilch	Pasteurisierte Kesselmilch
Molke	Käsebruch	Käsebruch
Käse vor dem Salzen	Molke	Molke
Käse nach dem Salzen	Käse vor dem Salzbad	Molke nach dem Pressen
Käse nach 21 Tagen Reifung	Käse nach dem Salzbad	Käse nach dem Salzbad
	Salzbad nach Käseentnahme	Salzbad nach Käseentnahme
	Käse nach 56 Tagen Reifung	Käse nach 112 Tagen Reifung

Flüssiges Analysematerial wurde bei 30 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Proben aus festem Analysematerial wurden ca. eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut. Vor dem Einwiegen wurde das flüssige Analysematerial mittels Schüttelns per Hand oder Laborschüttler homogenisiert. Die Proben aus festem Analysematerial wurden mittels Spatel sorgfältig durchmischt.

Für eine Doppelbestimmung wurde von Proben, welche pro Charge jeweils einfach vom MRI-MF beprobt wurden, zweimal 1 g Probe in jeweils ein 50-mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen. Für Probenmaterial, welches von Probenahmezeitpunkten stammt, an welchen zwei Teilproben vom MRI-MF gezogen wurden, um die Inhomogenität des Materials im jeweiligen Prozessschritt bzw. dem Endprodukt zu berücksichtigen (Tabelle 6), wurde die Doppelbestimmung wie folgt durchgeführt: Jeweils 0,5 g einer Teilprobe wurde in ein 50-mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und die zweite Teilprobe ad 1 g zugegeben.

Zum eingewogenen Probenmaterial wurden ca. 4 g Glasperlen (2 mm, Soda-Kalkglas, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland), 25 mL 0,2 %iger wässriger Ameisensäure und 15 mL *n*-Hexan hinzugegeben und für 30 min bei 500 U/min mittels Horizontalschüttler extrahiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 20 °C, 3600 × *g*) wurde ein Teil der wässrigen Phase in ein weiteres 50-mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Der pH-Wert der wässrigen Phase wurde durch die Zugabe von NH₃ (25 %, p. A.) auf 9,5-10,5 eingestellt und mittels pH-Teststreifen (MQuant®, pH 7,5-14, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) überprüft. Die wässrige Phase wurde erneut bei 4 °C und 3600 × *g* für 5 min zentrifugiert. Nach Bedarf wurde die wässrige Phase mittels Faltenfilter (Sorte 2020, Labsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland) filtriert. Die wässrige Phase wurde im Anschluss mittels Festphasenextraktion gereinigt. Hierfür wurden Polymeric Reversed Phase-Kartuschen (Strata™-XL 100 µm, 200 mg Bettmasse/6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit 5 mL Methanol und 5 mL Wasser aktiviert und konditioniert bevor 15 mL der wässrigen Phase aufgetragen wurden. Die Kartuschen wurden mit 6 mL Wasser gewaschen und im Anschluss die Reste der Waschlösung mittels Vakuums entfernt. Die Elution erfolgte mit 6 mL Methanol in ein 10-mL-Reagenzglas. Das Eluat wurde unter N₂-Strom im Wasserbad bei 50 °C bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 500 µL Methanol/Wasser (v/v, 10/90) aufgenommen und mit dem Laborschüttler sowie im Ultraschallbad (30 s) behandelt. Die Lösung wurde in ein 1,5-mL-Zentrifugengefäß überführt und für 20 min bei 4 °C und 12500 × *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres 1,5-mL-Zentrifugengefäß überführt und für mindestens 18 h bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Lösung mit dem Laborschüttler behandelt und anschließend erneut für 20 min bei 4 °C und 12500 × *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend membranfiltriert (0,2 µm, 13 mm, PVDF, WICOM Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland).

PA/PANO-Bestimmung und Datenauswertung

Für die Messungen wurde ein Shimadzu Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (LC-20AB, DGU-405, SIL-20AC HT, CTO-20AC, CBM-20A, Duisburg, Deutschland) verwendet, welches an ein API4000-Triplequadrupol-Massenspektrometer (Sciex, Darmstadt, Deutschland) gekoppelt war. Zur Ionisierung wurde die ESI im positiven Modus verwendet: Ionisierungsspannung, 2.500 V; Verneblergas, 50 psi; Heizgas, 50 psi; Vorhanggas, 40 psi; Temperatur, 600 °C; Kollisionsgaspegel, 7.

Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer 100 × 2,1 mm Kinetex™ 2,6 µm EVO C18 100 Å Säule, die durch eine SecurityGuard™ ULTRA EVO C18 2,1 mm Vorsäule geschützt war (beide Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Wässriges 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat mit einem pH von 9,0 (A) und Acetonitril (B) wurden als Lösungsmittel für die HPLC-Trennung verwendet. Die binären Gradientenbedingungen waren: 0,0 min 0 % B, 0,2 min 5,0 % B, 6,0 min 10,0 % B, 19,0 min 28,6 % B, 22,8 min 34,0 % B, 23,3 min 90,0 % B, 26,8 min 90,0 % B und 27,8 min 0,0 % B. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min. Die Säule wurde vor jedem Lauf 7,0 Minuten unter Startbedingung äquilibriert. Die Temperatur des Säulenofens war auf 30 °C eingestellt und das Injektionsvolumen betrug 10 µL. Die Bestimmung des PA/PANO-Gehalts erfolgte mittels externer Kalibration im jeweils zugehörigen Blindmaterial im Konzentrationsbereich 0,2 – 9,0 µg/L im Probenmaterial (Probenset Joghurt) bzw. 0,8 – 16,7 µg/kg im Probenmaterial (Probensets Picodon-, Feta-, Manchego). Für die Bestimmung des PA/PANO-Gehalts in den Proben, welche aus natürlich kontaminierter Milch der Transferversuche mit Ziegen und Schafen hergestellt wurden, wurden PA/PANO-Standardlösungen mit 54 PA/PANO verwendet. Für die Bestimmung des PA/PANO-Gehalts in den Proben, welche aus künstlich kontaminierter Ziegen- oder Schafsmilch hergestellt wurden, wurden Standardlösungen mit 21 PA/PANO verwendet.

Diese enthielten den PA/PANO-Standard mit 11 PA/PANO, der vor der Verarbeitung in die Milch dotiert wurde, sowie die zehn jeweils korrespondierenden PA/PANO (3.2.3.2.).

Die Messergebnisse wurden mit den zugehörigen Probereinwaagen verrechnet. Die Ergebnisse sind nicht wiederfindungskorrigiert. Für die weitere Datenauswertung wurden die Messwerte der zweifachen Probenaufarbeitung einer Probe gemittelt. Lag ein Gehalt der Doppelbestimmung unterhalb der im Rahmen der Validierung festgesetzten Bestimmungsgrenze (LOQ) (4.2.3.2., Tabellen 13 bis 16) wurde der Gehalt der Probe für die nachfolgenden Berechnungen 0 µg/L bzw. 0 µg/kg festgesetzt. Um den relativen Anteil am Gehalt bezogen auf den jeweiligen Gehalt in der Ausgangsmilch (hocherhitzte Joghurtmilch bzw. pasteurisierte Kesselmilch) zu erhalten, wurde der Gehalt der Probe auf den korrespondierenden ermittelten Gehalt der Ausgangsmilch der jeweiligen Charge bezogen.

Die relativen Anteile am Gehalt bezogen auf den Gehalt der jeweiligen Ausgangsmilch wurden im Anschluss über die drei Chargen gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die Datenerfassung und -verarbeitung erfolgte mit Analyst (Version 1.6.2, Sciex) und MultiQuant-Software (Version 3.0.1, Sciex). Microsoft Excel (Version 2019, Microsoft), OriginPro (Version 2020, Origin Lab) und R Studio (Version 2023.03.1, R Version 4.3.0) wurden zur weiteren Datenaufbereitung verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse

Es wurden 228 Milchproben aus Bayern und Schleswig-Holstein auf das Vorkommen von 54 PA/PANO untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 7 und 8 dargestellt. PA/PANO wurden in Milchproben aus beiden Modellregionen und zu jeder beprobten Jahreszeit nachgewiesen. In 26 Proben (11 %) wurde mindestens ein PA/PANO detektiert. Von diesen Proben waren 18 aus Bayern und acht aus Schleswig-Holstein. In Bayern waren PA/PANO somit in 17 % (18 von 108 Proben) und in Schleswig-Holstein in 6,7 % (8 von 120 Proben) der Proben nachweisbar. Der mittlere PA/PANO-Gesamtgehalt in den kontaminierten Milchproben lag bei 0,30 µg/L, bei einer Spannweite von 0,007 µg/L bis 5,6 µg/L. Der Median der positiven Proben lag bei 0,024 µg/L. Eine Übersicht über die Gehalte in den kontaminierten Milchproben ist in Abbildung 5 dargestellt (Klein et al. 2024).

Der mittlere PA/PANO-Gesamtgehalt aller 228 Milchproben betrug 0,034 µg/L. Nur vier Milchproben (Probe 1, 20, 134, 207) wiesen höhere PA/PANO-Gesamtgehalte als der mittlere PA/PANO-Gesamtgehalt auf: 0,13 µg/L (Milchsammeltank, ökologische Produktion), 0,59 µg/L (Milchsammeltank, ökologische Produktion), 0,73 µg/L (Milchtankstelle, ökologische Produktion) und 5,6 µg/L (Milchtankstelle, konventionelle Produktion) (Klein et al. 2024).

Die Milchprobe mit dem höchsten PA/PANO-Gesamtgehalt stammte aus konventionellem Landbau. 57 % der Milchproben aus Bayern und 43 % der Milchproben aus Schleswig-Holstein waren aus ökologischer Produktion. Insgesamt stammten 81 % der mit PA/PANO kontaminierten Milch aus ökologischem Landbau (Bayern: 78 %; Schleswig-Holstein: 88 %). In 19 von 26 PA/PANO-kontaminierten Proben wurde nur ein PA nachgewiesen. Insgesamt wurden 14 verschiedene PA/PANO vom Ly-Typ, Sc-Typ oder Ht-Typ nachgewiesen (Abbildung 6, Tabellen 7 und 8).

In den Milchproben aus Bayern waren Senkirkin (Senecionin-Typ / Sc-Typ) und Lycopsamin (Lycopsamin-Typ / Ly-Typ) die am häufigsten vorkommenden PA/PANO. Vier Betriebe aus Bayern (Betrieb 1, 2, 12, 20) zeigten in drei von vier aufeinanderfolgenden Saisons PA/PANO-kontaminierte Milch. Die PA/PANO-Muster der Milchproben waren zwischen den Betrieben vergleichbar. Mit Ausnahme von Probe 1 von Betrieb 1, waren die PA/PANO-Muster über die verschiedenen Jahreszeiten hinweg ähnlich, jedoch nicht identisch. Während in den Proben 19 und 49 aus Betrieb 1 nur Lycopsamin in Spuren nachgewiesen wurde, wurden in Probe 1 aus demselben Betrieb mehrere PA vom Heliotrin-Typ (Ht-Typ; Rinderin, Europin, Heliosupin und Heliotrin) nachgewiesen. Den höchsten Gehalt hatte dabei Rinderin (Klein et al. 2024).

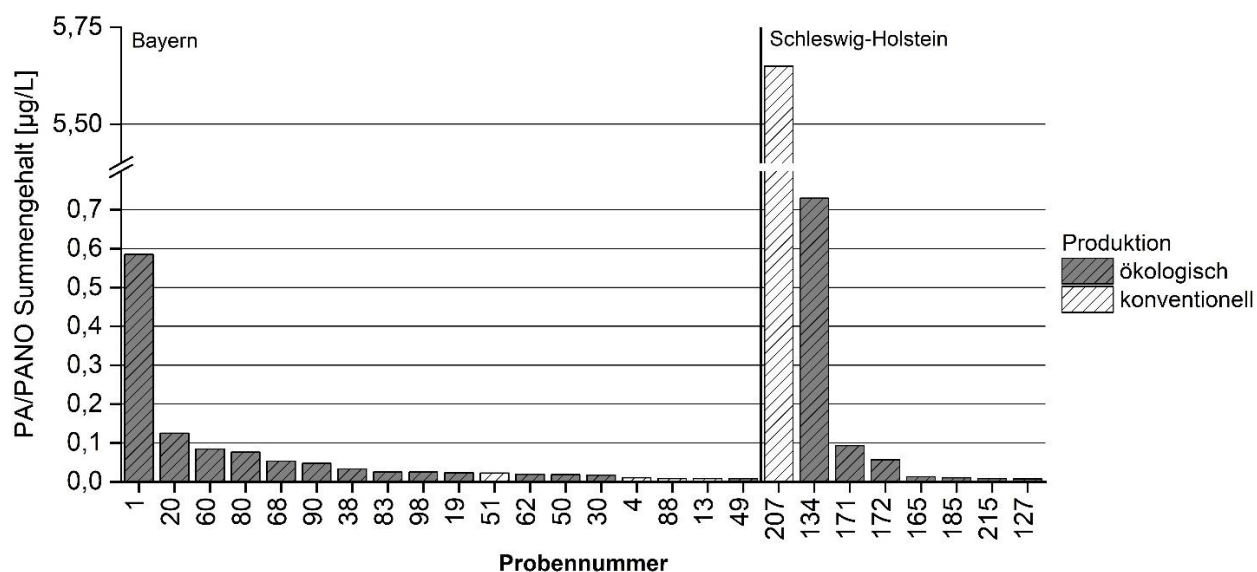


Abbildung 5: Pyrrolizidinalkaloid (PA) und PA-N-Oxid (PANO) Gesamtgehalt [$\mu\text{g/L}$] von PA/PANO-positiver Milch ($n = 26$), beprobt zwischen Winter/Frühjahr 2020 und Winter/Frühjahr 2022 in den Regionen Bayern (Probennummern 1-108) und Schleswig-Holstein (Probennummern 109-228). Sortiert nach Region und Gesamtgehalt. hellblau: ökologischer Landbau, grün: konventioneller Landbau (Klein, et al., 2024).

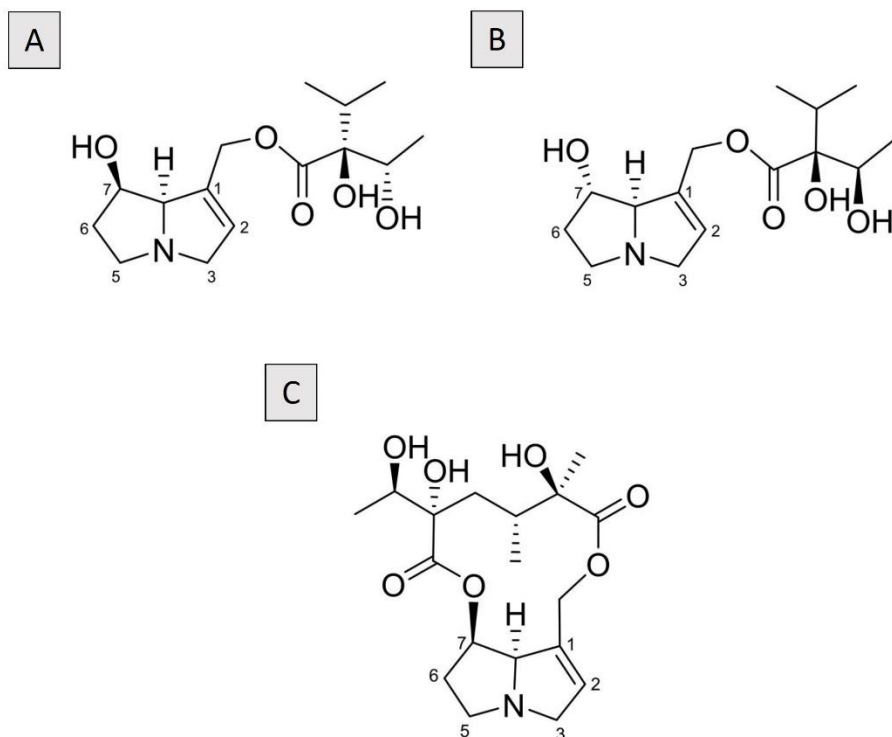


Abbildung 6: Beispiele für verschiedene Pyrrolizidinalkaloid-Typen: A.) Lycopsamin-Typ (Ly-Typ): Lycopsamin; B.) Heliotrin-Typ (Ht-Typ): Rinderin; C.) Senecionin-Typ (Sc-Typ): Jacolin (Klein et al. 2024).

Die PA/PANO-kontaminierten Milchproben aus Schleswig-Holstein stammten alle aus verschiedenen Betrieben. Insgesamt war Jacolin (Sc-Typ) in vier der acht (50 %) kontaminierten Milchproben aus Schleswig-Holstein enthalten (Tabelle 8) und war somit das am häufigsten auftretende PA in Milchproben aus Schleswig-Holstein. Jacolin trug stets mit > 85% zu den PA/PANO-Gesamtgehalten bei. In den Proben 134 und 204 wurde ein hoher Jacolin-Gehalt quantifiziert. Zusätzlich wurden in diesen Proben Jacobin und Jaconin (Sc-Typ) bestimmt. In Probe 207 (PA/PANO-Gesamtgehalt 5,6 µg/L) wurden neben Jacolin, Jacobin und Jaconin auch Jacolin-*N*-Oxid und Jacobin-*N*-Oxid nachgewiesen. In den anderen vier kontaminierten Milchproben aus Schleswig-Holstein wurden Heliosupin (Ht-Typ), Intermedin/Indicin (Ly-Typ), Lycopsamin (Ly-Typ) oder Rinderin (Ht-Typ) mit Gehalten unterhalb des LOQ nachgewiesen (Klein et al. 2024).

Tabelle 7: Pyrrolizidinalkaloid- (PA) und PA-N-Oxid- (PANO) Gehalt [$\mu\text{g/L}$] von PA/PANO-kontaminierter Milch aus der Modelregion Bayern. Die Proben stammten von mehreren ökologisch oder konventionell wirtschaftenden Betrieben. Nicht aufgeführte Proben wiesen keine nachweisbaren PA/PANO-Gehalte auf ($<$ Nachweisgrenze). Es sind nur Analyten aufgeführt, die in mindestens einer Probe aus Bayern oder Schleswig-Holstein nachgewiesen wurden. Die PA/PANO-Gehalte wurden gegebenenfalls auf zwei signifikante Stellen gerundet (Klein et al. 2024).

Probe	Jahreszeit	Betrieb	Herstellung	Pyrrolizidinalkaloid /Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxid Gehalt [$\mu\text{g/L}$]														Gesamt- gehalt ^a [$\mu\text{g/L}$]
				Erucifolin	Echinatin	Europin	Heliosupin	Heliotrin	Indicin/ Intermedin	Jacobin	Jacobin-N-Oxid	Jacolin	Jacolin-N-Oxid	Jaconin	Lycopsamin	Rinderin	Senkirkirin	
1	A	1	o	n.n.	n.n.	0,057	0,082	0,095	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,35	n.n.	0,59
4	A	4	c	n.n.	$< 0,019$	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,010
13	A	13	c	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,016$	n.n.	n.n.	0,008
19	B	1	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,023	n.n.	n.n.	0,023
20	B	2	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,025	n.n.	0,10	0,13
30	B	12	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,034$	0,017
38	B	20	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,033	n.n.	n.n.	0,033
49	C	1	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,016$	n.n.	n.n.	0,008
50	C	2	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,018	n.n.	n.n.	0,018
51	C	3	c	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,022	n.n.	n.n.	0,022
60	C	12	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,020	n.n.	0,064	0,084
62	C	14	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,019	n.n.	n.n.	0,019
68	C	20	o	0,024	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,029	n.n.	n.n.	0,053
80	D	2	o	0,010	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,066	0,076
83	D	5	o	n.n.	0,025	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,025
88	D	10	c	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,016$	n.n.	n.n.	0,008
90	D	12	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,047	0,047
98	D	20	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,025	n.n.	n.n.	0,025

A, Winter/Frühjahr 2020; B, Sommer/Herbst 2020; C, Winter/Frühjahr 2021; D, Sommer/Herbst 2021; o, ökologischer Landbau; c, konventioneller Landbau; n.n., nicht nachgewiesen ($<$ Nachweisgrenze (LOD), für siehe Tabelle 4); ^a Pyrrolizidinalkaloide und Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxide, die unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) nachgewiesen wurden, wurden mit einem Gehalt von 0,5 LOQ berücksichtigt

Tabelle 8: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden (PA) und PA-N-Oxid (PANO) [$\mu\text{g/L}$] von PA/PANO-kontaminierter Milch aus der Modelregion Schleswig-Holstein. Die Proben stammten von mehreren ökologisch oder konventionell wirtschaftenden Betrieben). Nicht gelistete Proben wiesen keine nachweisbaren PA/PANO-Gehalte auf ($<$ Nachweisgrenze). Es sind nur Analyten aufgeführt, die in mindestens einer Probe aus Bayern oder Schleswig-Holstein nachgewiesen wurden. Die PA/PANO-Gehalte wurden gegebenenfalls auf zwei signifikante Stellen gerundet. (Klein et al. 2024).

Probe	Jahreszeit	Betrieb	Herstellung	Pyrrolizidinalkaloid /Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxid Gehalt [$\mu\text{g/L}$]														Gesamt- gehalt ^a [$\mu\text{g/L}$]
				Erucifolin	Echinatin	Europin	Heliosupin	Heliotrin	Indicin/ Intermedin	Jacobin	Jacobin-N-Oxid	Jacolin	Jacolin-N-Oxid	Jaconin	Lycopsamin	Rinderin	Senkirkin	
127	B	49	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,014$	n.n.	0,007
134	B	56	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,039$	n.n.	0,639	n.n.	0,071	n.n.	n.n.	n.n.	0,73
165	C	52	o	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,026$	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,013
171	C	58	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,093	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,093
172	C	59	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,057	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,057
185	D	74	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,019$	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,010
207	E	68	c	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,12	$< 0,019$	5,4	0,036	0,13	n.n.	n.n.	n.n.	5,6
215	E	91	o	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$< 0,016$	n.n.	n.n.	0,008

B, Sommer/Herbst 2020; C, Winter/Frühjahr 2021; D, Sommer/Herbst 2021; E, Winter/Frühjahr 2022; o, ökologischer Landbau; c, konventioneller Landbau; n.n., nicht nachgewiesen ($<$ Nachweisgrenze (LOD), für siehe Tabelle 4); ^a Pyrrolizidinalkaloide und Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxide, die unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) nachgewiesen wurden, wurden mit einem Gehalt von 0,5 LOQ berücksichtigt

4.2. Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten

4.2.1. Herstellung von Milchprodukten (MRI)

Bei der Herstellung von Joghurt kann der größte Teil der Milch ohne Veränderung der Zusammensetzung verarbeitet werden. In der Käseherstellung liegt die Ausbeute unter 20 %; aus 100 L pasteurisierter Kuhmilch wurden 11,6 bis 12,2 kg Edamer, aus 20 L pasteurisierter Ziegenmilch wurden 2,4 bis 3,0 kg Picodon bzw. aus 6 L pasteurisierter Schafmilch 0,9 bis 1,2 kg Manchego hergestellt, abhängig von der variablen Trockenmasse der Schaf- und Ziegenmilch wie auch der angestrebten Trockenmasse des Käses. Dabei kommt es zum beabsichtigten Abtrennen des Teilstroms Molke (Abbildungen 2 bis 4) und es treten Produktverluste durch unvollständiges Entleeren von Anlagen und Gefäßen auf. Andere Prozessschritte tragen Stoffströme ein, die sich auf die Konzentration der PA/PANO auswirken, zum Beispiel beim Waschen des Käsebruchs oder Salzen des Käses. Die Massenbilanz in Abbildung 7 fasst die zu- und fortgehenden Stoffströme als Grundlage für die Bilanzierung der PA/PANO-Gehalte auf allen Stufen beispielhaft für die Herstellung von Edamer aus Kuhmilch zusammen.

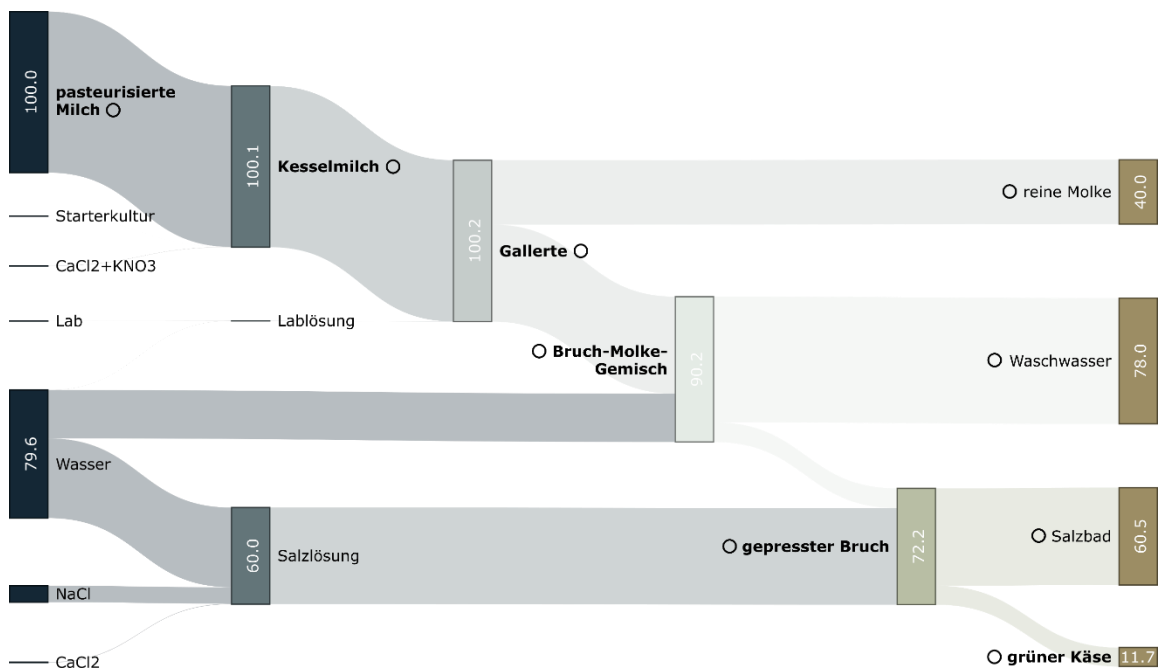


Abbildung 7: Bilanz aller zu- und fortführenden Stoffströme bei der Herstellung von Schnittkäse Typ Edamer aus Kuhmilch (Abbildung 2 (b)) in Form eines Sankey-Diagramms; Bezugsgröße: 100 kg pasteurisierte Kuhmilch, fett gedruckt: Hauptweg vom Ausgangsstoff pasteurisierte Milch bis zum Endprodukt grüner Käse, Kreis: alle Probenahmepunkte zur Analyse der PA/PANO-Gehalte und von prozessbegleitenden Parametern (Tabelle 9)

4.2.2. Bestimmung der Milchinhaltsstoffe und Produktparameter (MRI)

Tabelle 9 fasst die Inhaltsstoffe und Tabelle 10 die physikalischen Parameter aller aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch hergestellten Produkte zusammen. Alle Versuche wurden $i \geq 7$ wiederholt, in jeweils mindestens drei Versuchen mit Milch aus der Transferstudie und vier Versuchen mit künstlich kontaminierter Milch. Die angegebenen Mittelwerte und Streumaße beziehen sich auf die Gruppe aller Wiederholungen pro Tierart und Produkt. Bezüglich der Inhaltsstoffe wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Produkten aus Milchen der Transferstudien und künstlich kontaminierten Milch gefunden. Diese wurden in den Produktgruppen jeweils zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammensetzung aller Produkte aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch der Transferstudien bzw. aus der künstlich kontaminierten Milch; arithmetisches Mittel und Standardabweichung aus i Versuchen pro Produkt und n analysierten Proben pro Produkt

Tierart	Produkt Typ	Inhaltsstoffe			Trockenmasse		Fett		Protein		F.i.Tr. ^a
		Reife- zeit	i								%
					n	g/100 g	n	g/100 g	n	g/100 g	
Kuh	Rohmilch	–	7	7	13,06 ± 0,36	7	4,087 ± 0,280	7	3,516 ± 0,105	–	–
	Joghurt ^b	6 d	7	21	13,97 ± 0,78	21	4,493 ± 0,155	21	2,814 ± 0,403	–	–
	Milchgel ^c	6 d	7	21	13,88 ± 0,29	23	4,480 ± 0,154	21	3,058 ± 0,439	–	–
	Edamer	56 d	7	43	54,55 ± 0,76	28	29,68 ± 1,17	28	20,51 ± 1,16	54,41	–
Schaf	Rohmilch	–	8	22	15,72 ± 0,33	8	5,523 ± 0,446	8	4,204 ± 0,155	–	–
	Feta	56 d	7	36	41,43 ± 3,46	28	21,48 ± 2,64	28	14,91 ± 1,81	51,85	–
	Manchego	112 d	7	42	71,01 ± 2,66	28	35,52 ± 2,79	28	28,95 ± 0,83	50,02	–
Ziege	Rohmilch	–	7	24	11,78 ± 0,18	14	3,389 ± 0,162	14	2,933 ± 0,033	–	–
	Joghurt ^b	6 d	7	21	11,75 ± 0,18	21	3,375 ± 0,160	42	2,571 ± 0,319	–	–
	Milchgel ^c	6 d	7	21	12,93 ± 0,19	21	3,327 ± 0,173	42	2,556 ± 0,384	–	–
	Picodon	21 d	7	14	51,25 ± 5,60	14	28,58 ± 2,94	28	20,67 ± 2,88	55,77	–

^a F.i.Tr., berechneter Fettgehalt in der Trockenmasse

^b hocherhitzte Joghurtmilch mit Milchsäurebakterien bis pH 4,6 fermentiert

^c hocherhitzte Joghurtmilch mit Glucono-delta-Lacton (GDL) auf pH 4,6 gesäuert

Tabelle 10: Physikalische Parameter aller Produkte aus kontaminierter Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch der Transferstudien bzw. aus der künstlich kontaminierten Milch; arithmetisches Mittel und Standardabweichung aus *i* Versuchen pro Produkt und *n* analysierten Proben pro Produkt

Tierart	Produkt			physikalische Parameter			
	Typ	Reifezeit	<i>i</i>	pH		SH ^a	
				<i>n</i>	–	<i>n</i>	–
Kuh	Rohmilch	–	7	7	6,674 ± 0,070	7	6,679 ± 0,168
	Joghurt ^b	6 d	7	9	4,187 ± 0,018	9	40,26 ± 0,11
	Milchgel ^c	6 d	7	9	4,610 ± 0,060	9	24,71 ± 0,41
	Edamer	56 d	7	14	5,236 ± 0,095	–	–
Schaf	Rohmilch	–	8	8	6,684 ± 0,067	8	6,820 ± 0,483
	Feta	56 d	7	14	5,034 ± 0,261	–	–
	Manchego	112 d	7	14	5,111 ± 0,072	–	–
Ziege	Rohmilch	–	7	14	6,674 ± 0,050	7	5,820 ± 0,334
	Joghurt ^b	6 d	7	18	4,233 ± 0,027	–	–
	Milchgel ^c	6 d	7	18	4,541 ± 0,035	–	–
	Picodon	21 d	7	14	5,820 ± 0,194	–	–

^a Bestimmung der Soxhlet-Henkel-Zahl nur in flüssigen Proben möglich

^b hocherhitzte Joghurtmilch mit Milchsäurebakterien bis pH 4,6 fermentiert

^c hocherhitzte Joghurtmilch mit Glucono-delta-Lacton (GDL) auf pH 4,6 gesäuert

Der Proteingehalt, bestimmt mit der Dumas-Methode, wies die höchste Variabilität auf. Insbesondere für die fermentierten Milchprodukte Joghurt (max. CV 14,3 %) und Milchgel (max. CV 15,0 %) war aufgrund der inhomogenen Probenmatrix die Wiederholbarkeit der Einzelmessungen außerhalb der Erfahrungswerte für die Dumas-Methode (0,002 %, bezogen auf den Stickstoffgehalt) oder nach Kjeldahl (0,006 % N) (VDLUFA 2010). Bei höherem Proteingehalt in den Käsen sinkt der Variationskoeffizient auf 5,6 % in Edamer aus Kuhmilch bis 13,9 % in Picodon aus Ziegenmilch (Tabelle 9). Die erhöhte Variabilität des Proteingehalts im Ziegenmilchkäse erfolgt analog der größeren Schwankungsbreite der Trockenmasse durch das Abtropfen der Molke.

Die fermentierten Milchprodukte aus Kuh- und Ziegenmilch, Rührjoghurt und das beispielhaft mit Glucono-delta-lacton (GDL) gesäuerte Milchgel wiesen gegenüber handelsüblichem Joghurt eine geringere Trockenmasse und Proteingehalt auf. Für diese Studie wurde auf eine Standardisierung mittels Milchpulver verzichtet, welche die große Variabilität der Zusammensetzung von Ziegenmilch ausgleichen könnte. Die Pulver wären aus einer anderen Quelle außerhalb der Studie und damit unbekannter Eintragsweg für PA/PANO. Die weitere Verarbeitung, und damit die Stabilität und der Abbau der PA/PANO, war jedoch mit Handelsprodukten vergleichbar (Abbildung 2 (a)). Joghurt und GDL-Milchgele unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Zusammensetzung und dienten zum Vergleich, wie sich eine rein chemische Säuerung, ohne metabolische Effekte der Starterkultur, auf die PA/PANO-Gehalte auswirken (Tamime & Robinson 2007).

Durch die, während der 6-tägigen Lagerung fortwährende mikrobielle Säuerung des Joghurts fiel der pH-Wert auch nach Ende der Fermentation von 4,6 weiter auf 4,2 ab, während das GDL-Milchgel bei 4,5 stoppte. Analog steigt der SH (Soxhlet-Henkel)-Wert und damit die Pufferkapazität des mikrobiell gesäuerten Joghurts an (Tabelle 10, siehe Kuhmilch).

Der aus Kuhmilch hergestellte Edamer entsprach der Einordnung in die Käsegruppe (fester) Schnittkäse: die Trockenmasse des Produkts betrug 54,5 % nach einer typischen Lagerzeit von 8 Wochen (Tabelle 9). Das Verhältnis des Fettgehalts zur Trockenmasse (F.i.Tr.) lag mit 54,4 % höher als bei Handelsprodukten (45 - 50 % F.i.Tr.), für die der Fettgehalt der Käsereimilch meist reduziert wird (McSweeney et al. 2017). Für alle Käse in dieser Studie wurde die Milch verwendet wie erhalten und das Fett:Protein-Verhältnis nicht standardisiert (Abbildung 2), um die Massenbilanz und PA/PANO-Gehalte nicht zu verändern. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie bei handelsüblichen Produkten. Die gereiften Edamer entsprachen in Geruch und Aussehen den Erwartungen an Handelsprodukte.

Aus Schafmilch konnten Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego hergestellt werden. Diese waren aufgrund ihrer Trockenmasse nach einer typischen Reifezeit von 8 Wochen bzw. 4 Monaten den Gruppen Weich- bzw. Hartkäse zuzuordnen (Tabelle 9). Der Fettanteil betrug durch den hohen Ausgangsgehalt der rohen Schafmilch von 5,1 % (Kuhmilch: 4,1 %) 50,2 % F.i.Tr. in Feta und 48,3 % F.i.Tr. in Manchego (McSweeney et al. 2017). Beide Käse waren in ihrem Reifungsverhalten, Aussehen und Geruch produkttypisch. Sie entsprachen den Erwartungen an gleichartige Handelsprodukte.

Der aus Ziegenmilch hergestellte Picodon entsprach der Einordnung in die Käsegruppe Weichkäse: die Trockenmasse des Produkts betrug zu Beginn 43,0 %, und stieg auf 51,3 % nach einer typischen Lagerzeit von 3 Wochen (Tabelle 9). Das Verhältnis des Fettgehalts zur Trockenmasse lag mit 55,8 % höher als bei Handelsprodukten (45 % F.i.Tr.), da ausschließlich mit Milchen vom Beginn der Laktationsperiode der Ziegen gearbeitet wurde. Diese weist zu Beginn und am Ende der Laktation die höchsten Fettgehalte auf (Arrigo & Frioud 2021). Die gereiften Picodon entsprachen in Geruch und Aussehen den Erwartungen an Handelsprodukte.

4.2.3. PA/PANO-Analytik

4.2.3.1. PA/PANO-Analytik der Probensets Joghurt und Schnittkäse Typ Edamer aus künstlich und natürlich kontaminierter Kuhmilch

Validierung der Methodik für die Probensets Joghurt und Schnittkäse Typ Edamer aus Kuhmilch

Die Methodik für die Analytik der Proben der Probensets Joghurt und Edamer aus Kuhmilch wurde mittels Blindmaterials, welches an der LMU im kleinen Labormaßstab hergestellt wurde, validiert. Das Blindmaterial wurde in Anlehnung an die Vorgehensweise der Herstellung der Milchprodukte aus kontaminierter Kuhmilch (3.2.1.1.) mit entsprechender Anpassung an den Labormaßstab verfahren. Für die Evaluierung der Methodik wurde das Blindmaterial im Vierfachansatz zu 2 µg/kg bzw. µg/L dotiert.

Die Kenndaten zu den Matrices Joghurt und Milchgel sind in Tabelle 11 dargestellt. Der Median der Wiederfindungsraten der 39 PA/PANO war in Joghurt bei 88 % und in Milchgel bei 74 %. Merenskin-*N*-Oxid, Riddelliin-*N*-Oxid und Seneciophyllin-*N*-Oxid wiesen Wiederfindungsraten zwischen 9 % (Merenskin-*N*-Oxid) und 50 % (Seneciophyllin-*N*-Oxid) in Joghurt und Milchgel auf. Die zugehörige RSD war zwischen 7 % (Seneciophyllin-*N*-Oxid) und 34 % (Merenskin-*N*-Oxid) bzw. 10 % (Seneciophyllin-*N*-Oxid) und 24 % (Merenskin-*N*-Oxid) in Joghurt bzw. Milchgel. Im Gegensatz dazu wies Merepoxin-*N*-Oxid eine WFR von 138 % in Joghurt und 118 % in Milchgel auf mit einer RSD von 10 % bzw. 20 %. Aufgrund ihrer Wiederfindungsrate wurden diese vier PANO als lediglich semiquantitativ bestimmbar eingestuft. Merenskin-*N*-Oxid, Merepoxin-*N*-Oxid und Riddelliin-*N*-Oxid waren ebenfalls in dem Probenmaterial Milch aufgrund ihrer sehr geringen bzw. hohen WFR lediglich semiquantitativ bestimmbar (Klein et al. 2022).

Die RSD war in Joghurt für alle PA/PANO, mit Ausnahme von Merenskin-*N*-Oxid (34 %), < 20 %. In Milchgel war die RSD für 35 PA/PANO < 20%. Für Jacobin-*N*-Oxid, Lasiocarpin, Merenskin-*N*-Oxid und Merepoxin-*N*-Oxid wurden RSD-Werte von 20 % bis 33 % ermittelt.

Für die Linearität der Messmethode in der Matrix Joghurt aus Kuhmilch wurden für alle PA/PANO R^2 -Werte von > 0,99 ermittelt. Als Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde für alle PA/PANO 0,1 µg/L festgesetzt, dies entsprach der Konzentration des kleinsten Kalibrierstandards bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial, bei der ein Signal-Rauschverhältnis von > 10 für den Quantifier und ein Signal-Rauschverhältnis von > 3 für den Qualifier bestimmt wurde.

Tabelle 11: Überblick über die Kenndaten der Methodik für die Ermittlung des Pyrrolizidinalkaloid (PA) und PA-N-Oxid-(PANO)-Gehalts in Joghurt und Milchgel aus Kuhmilch. Durchschnittliche Wiederfindungsraten (WFR) und Wiederholbarkeit (ausgedrückt als relative Standardabweichung, RSD_r) bei einer Dotierung auf 2 µg/L mit $n = 4$ Wiederholungen und Bestimmungsgrenze (LOQ). Der Kalibrierbereich war 0,1 bis 5,5 µg/L ($n = 5$) bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial.

PA/PANO	Joghurt			Milchgel		
	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]
Echimidin	0,1	87	5	0,1	74	9
Echimidin-N-Oxid	0,1	92	10	0,1	80	4
Erucifolin	0,1	109	5	0,1	83	5
Erucifolin-N-Oxid	0,1 ^a	68	6	0,1 ^a	62	4
Heliotrin	0,1	100	12	0,1	82	8
Heliotrin-N-Oxid	0,1	98	6	0,1	86	11
Integerrimin	0,1	86	8	0,1	63	11
Integerrimin-N-Oxid	0,1	88	4	0,1	82	4
Jacobin	0,1	114	10	0,1	103	3
Jacobin-N-Oxid	0,1	85	7	0,1	71	33
Jacolin	0,1	98	5	0,1	88	11
Jacolin-N-Oxid	0,1	79	6	0,1	71	4
Jaconin	0,1	68	5	0,1	51	5
Lasiocarpin	0,1	90	18	0,1	74	27
Lasiocarpin-N-Oxid	0,1	100	3	0,1	83	2
Lycopsamin	0,1	110	7	0,1	94	8
Lycopsamin-N-Oxid	0,1 ^a	84	5	0,1 ^a	72	3
Merenskin	0,1	77	13	0,1	59	9
Merenskin-N-Oxid	0,1	14	34	0,1	9	24
Merepoxin	0,1	106	10	0,1	90	3
Merepoxin-N-Oxid	0,1	138	10	0,1	118	20
Monocrotalin	0,1	92	8	0,1	75	8
Monocrotalin-N-Oxid	0,1	76	3	0,1	73	4
Retrorsin	0,1	99	6	0,1	78	5
Retrorsin-N-Oxid	0,1	87	7	0,1	76	12
Riddelliin	0,1	85	6	0,1	68	6
Riddelliin-N-Oxid	0,1 ^a	23	7	0,1 ^a	19	13
Sceleratin	0,1	93	8	0,1	74	6
Sceleratin-N-Oxid	0,1	79	5	0,1	67	8
Senecionin	0,1	79	11	0,1	69	9
Senecionin-N-Oxid	0,1	96	3	0,1	84	6
Seneciphyllin	0,1	92	7	0,1	68	5
Seneciphyllin-N-Oxid	0,1 ^a	50	7	0,1 ^a	47	10
Senecivernin	0,1	78	10	0,1	70	15
Senecivernin-N-Oxid	0,1	94	5	0,1	79	4
Senkirkin	0,1	89	6	0,1	79	6
Spartiodin	0,1	86	8	0,1	67	2
Usaramin	0,1	95	7	0,1	78	5
Usaramin-N-Oxid	0,1	79	5	0,1	70	10

^a Linearitätsbereich bis 2,75 µg/L, $n = 4$ Kalibrierpunkte

Die ermittelten Kenndaten für die Matrices des Schnittkäses Typ Edamer und der zugehörigen Prozessvorstufen sind in Tabelle 12. Im Probenmaterial Molke wurden WFR zwischen 7 % (Merenskin-*N*-Oxid) und 106 % (Lycopsamin) mit einem Median von 78 % ermittelt. Für das finale Produkt (Käse nach 56 Tagen Reifung) wurden WFR zwischen 9 % (Merenskin-*N*-Oxid) und 81 % (Lycopsamin) mit einem Median von 62 % bestimmt. Insgesamt schwanken die Wiederfindungsraten der verschiedenen Analyten deutlich zwischen den unterschiedlichen Probenmatrices. Zum Beispiel wies Jacobin in der Molke nach dem Pressen eine Wiederfindung von 74 % und im Edamer nach dem Salzbad 144 % auf. Das bereits in der Milch lediglich semiquantitativ erfassbare Merenskin-*N*-Oxid konnte nicht oder nur mit sehr großen Schwankungen in mehreren Matrices des Probensets bestimmt werden. Eine Bestimmung, wenn auch nur qualitativ, von Merenskin-*N*-Oxid (Isomer von Jaconin-*N*-Oxid) konnte daher für das Probenset Edamer nicht erreicht werden.

Die RSD-Werte waren beispielsweise in der Molke < 15 % und in dem Käse nach 56 Tagen Reifung < 20 %, mit Ausnahme von Merenskin-*N*-Oxid. Die RSD-Werte waren für die PA/PANO, welche ein Chlor-Atom in ihrer Molekülstruktur aufweisen, z. B. Jaconin, in den Matrices Käse nach dem Salzbad und dem Salzbad nach der Käseentnahme stark erhöht (Tabelle 12).

Als Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde die Konzentration des kleinsten Kalibrierstandards bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial, bei der ein Signal-Rauschverhältnis von > 10 für den Quantifier und ein Signal-Rauschverhältnis von > 3 für den Qualifier bestimmt wurde, festgesetzt. Für den Großteil der Analyt-Matrix-Kombinationen war diese 0,1 µg/L, insgesamt lag die Bestimmungsgrenze zwischen 0,1 µg/L bis 0,9 µg/L bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial.

Die Auswertung der Linearität in den Matrixkalibrierungen ergab, dass obwohl ein RSD von ≤ 15 % für den Großteil der PA/PANO festgestellt wurde, die Möglichkeit einer vollständig quantitativen Bestimmung insgesamt begrenzt war, weshalb die für die Probenmaterialien des Probensets Schnittkäse Typ Edamer als semiquantitativ bestimmt gewertet wurden (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 12: Überblick über die Kenndaten der Methodik für die Ermittlung des Pyrrolizidinalkaloid (PA) und PA-*N*-Oxid-(PANO)-Gehalts in den Proben des Edamer-Sets. Durchschnittliche Wiederfindungsraten (WFR) und Wiederholbarkeit (ausgedrückt als relative Standardabweichung, RSD_r) bei einer Dotierung auf 2 µg/L bzw. µg/kg mit *n* = 4 Wiederholungen und Bestimmungsgrenze (LOQ). Der Kalibrierbereich war 0,1 - 5,5 µg/L bzw. 0,1 - 5,0 µg/kg bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial.

	Käsebruch			Molke			Molke nach dem Pressen			Käse nach dem Salzbad			Käse nach 56 Tagen Reifung			Salzbad		
PA/PANO	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/kg]	WFR ^a [%]	RSD ^a [%]	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]
Echimidin	0,1	70	10	0,1	78	6	0,1	63	4	0,1	95	6	0,1	64	6	0,1	76	2
Echimidin- <i>N</i> -Oxid	0,1	82	7	0,1	76	4	0,1	73	7	0,1	80	4	0,1	52	4	0,1	82	10
Erucifolin	0,1	75	9	0,4	87	3	0,1	69	5	0,4	134	9	0,1	78	7	0,1	83	7
Erucifolin- <i>N</i> -Oxid	0,1	71	7	0,4	76	4	0,1	62	3	0,1	75	11	0,1	55	10	0,1	91	9
Heliotrin	0,1	82	7	0,1	80	4	0,1 ^b	87	8	0,1	100	6	0,1	60	3	0,1	81	10
Heliotrin- <i>N</i> -Oxid	0,1	90	4	0,1	87	2	0,1	87	4	0,1	85	4	0,1	57	6	0,1	77	15
Integerrimin	0,1	73	14	0,1	75	6	0,1	59	5	0,1	111	6	0,4	70	3	0,1	67	8
Integerrimin- <i>N</i> -Oxid	0,1	83	5	0,1	75	3	0,1	80	7	0,1	80	4	0,1	53	4	0,1	93	6
Jacobin	0,1	92	9	0,4	102	2	0,1	74	4	0,1	144	6	0,1	81	5	0,1	101	14
Jacobin- <i>N</i> -Oxid	0,1	68	8	0,1	76	5	0,1	72	11	0,1 ^b	73	5	0,1	59	12	0,1	87	11
Jacolin	0,1	79	9	0,1	72	6	0,1	73	4	0,4	110	6	0,9	69	8	0,1	65	13
Jacolin- <i>N</i> -Oxid	0,1	75	9	0,1	79	3	0,1	69	5	0,1	83	5	0,4	54	6	0,1	79	12
Jaconin	0,1	60	8	0,1	54	10	0,1	57	4	0,1	69	40	0,4	58	16	0,1	26	29
Lasiocarpin	0,1	84	18	0,1	64	13	0,1	91	19	0,1	79	5	0,1	59	3	0,1	79	3
Lasiocarpin- <i>N</i> -Oxid	0,1	87	5	0,1	80	6	0,1	85	9	0,1	81	7	0,1	53	3	0,1	97	8
Lycopsamin	0,1	84	8	0,4	106	4	0,1	86	7	0,1	136	5	0,1	81	5	0,1	86	13
Lycopsamin- <i>N</i> -Oxid	0,1	82	4	0,1	104	5	0,1	74	4	0,1	78	5	0,1	57	4	0,1	88	7
Merenskin	0,1	69	8	0,4	63	7	0,1	69	15	0,4	83	19	0,4	63	9	0,1	37	33
Merenskin- <i>N</i> -Oxid	0,1	13	12	0,4	7	32	n.b.	n.b.	n.b.	0,4	11	161	0,4	9	77	n.b.	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmbar

^a *n* = 3 Replikate

^b höchster verwendeter Kalibrierstandard war 2,5 µg/L

Tabelle 12: Fortsetzung

	Käsebruch			Molke			Molke nach dem Pressen			Käse nach dem Salzbad			Käse nach 56 Tagen Reifung			Salzbad		
PA/PANO	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	LOQ [µg/kg]	WFR ^a [%]	RSD ^a [%]	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]
Merepoxin	0,1	86	8	0,9	98	7	0,1	79	8	0,1	125	19	0,4	63	15	0,1	109	19
Merepoxin- <i>N</i> -Oxid	0,1	116	10	0,4	96	6	0,1 ^b	99	14	0,1	81	8	0,4	73	13	0,1	104	6
Monocrotalin	0,1	76	5	0,4	94	5	0,1	76	2	0,1	128	7	0,1	75	1	0,1	87	13
Monocrotalin- <i>N</i> -Oxid	0,1	74	7	0,1	75	4	0,1	70	5	0,1	86	7	0,4	65	1	0,1	81	4
Retrorsin	0,1	77	12	0,4	87	4	0,1	73	2	0,1	117	10	0,1	66	6	0,1	83	15
Retrorsin- <i>N</i> -Oxid	0,1	80	10	0,1	78	6	0,1	79	6	0,1	80	5	0,4	62	6	0,1	74	18
Riddelliin	0,1	68	15	0,4	71	7	0,1	65	5	0,4	100	4	0,1	59	8	0,1	77	4
Riddelliin- <i>N</i> -Oxid	0,1	31	11	0,1	16	10	0,1 ^b	28	6	0,1	26	19	0,1	32	6	0,1	72	7
Sceleratin	0,1	75	11	0,4	88	4	0,1	74	7	0,4	113	2	0,1	68	7	0,1	85	7
Sceleratin- <i>N</i> -Oxid	0,1	78	7	0,4	72	4	0,1	61	7	0,1	80	6	0,1	56	3	0,1	77	8
Senecionin	0,1	71	21	0,1	80	6	0,1	62	9	0,1	114	8	0,4	76	1	0,1	70	5
Senecionin- <i>N</i> -Oxid	0,1	83	7	0,1	83	7	0,1	78	4	0,1	81	6	0,1	56	4	0,1	90	11
Seneciphyllin	0,1	64	13	0,1	75	5	0,1	65	4	0,1	112	5	0,1	72	5	0,1	75	7
Seneciphyllin- <i>N</i> -Oxid	0,1	54	7	0,1	44	7	0,1	56	5	0,1	48	8	0,1	42	8	0,1	82	18
Senecivernin	0,1	71	8	0,1	78	9	0,1	63	8	0,1	103	8	0,1	72	1	0,1	68	7
Senecivernin- <i>N</i> -Oxid	0,1	83	6	0,1	77	3	0,1	73	4	0,1	81	7	0,1	58	4	0,1	88	7
Senkirkin	0,1	75	7	0,1	75	5	0,1	67	11	0,1	86	5	0,1	53	6	0,1	81	3
Spartioidin	0,1	70	12	0,4	74	5	0,1	65	6	0,4	104	7	0,1	66	3	0,1	70	3
Usaramin	0,1	76	6	0,4	85	4	0,1	75	5	0,4	108	10	0,1	66	3	0,1	86	8
Usaramin- <i>N</i> -Oxid	0,1	73	13	0,1	80	3	0,1	68	4	0,1	79	7	0,4	68	14	0,1	66	9

n.b.: nicht bestimmbar

^a n = 3 Replikate^b höchster verwendeter Kalibrierstandard war 2,5 µg/L

PA/PANO in Joghurt aus Kuhmilch sowie dessen Prozessstufen

A. Künstlich kontaminierter Joghurt

Für neun der zehn eingesetzten PA wurde in den Joghurtproben aus künstlich kontaminierter Milch ein relativer Anteil des PA-Gehalts von $71,3 \pm 14,6 \%$ bis $86,2 \pm 21,5 \%$ bezogen auf die Ausgangsmilch (hocherhitzte Joghurtmilch) bestimmt (Abbildung 8).

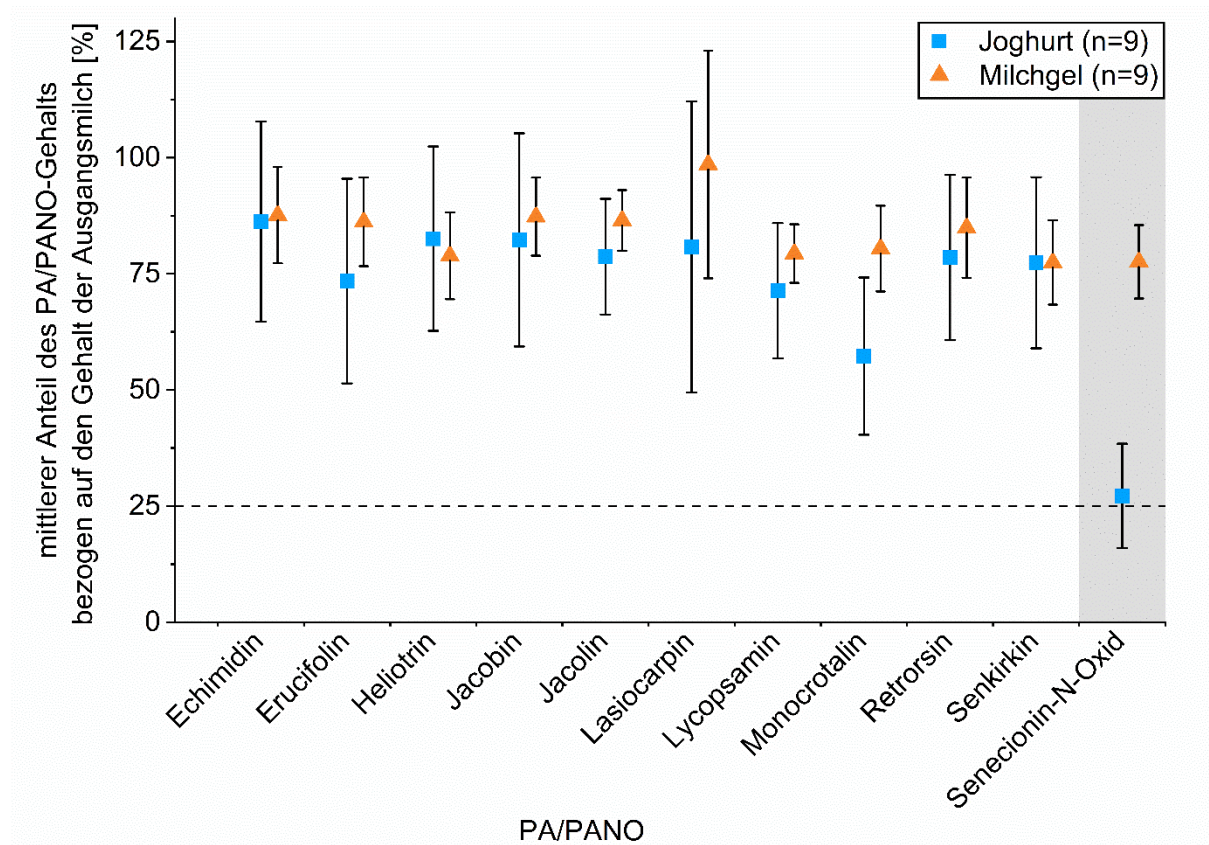


Abbildung 8: Pyrrolizidinalkaloide und -N-Oxide (PA/PANO) in Joghurt aus künstlich kontaminierter Kuhmilch: Relativer Anteil des Gehalts der eingesetzten PA/PANO bezogen auf den Gehalt der dotierten Ausgangsmilch (hocherhitzte Joghurtmilch) für die Produkte Joghurt (blau, aus $i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern, insgesamt $n = 9$ Proben) und Milchgel (orange, aus $i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern, insgesamt $n = 9$ Proben). Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der eingesetzten dotierten Milch der jeweiligen Charge bezogen und anschließend gemittelt.

Unter Berücksichtigung der vorliegenden SD deuten die Daten daraufhin, dass im Rahmen der Joghurtherstellung für diese PA nicht von einer relevanten Verringerung des relativen Anteils des PA-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch ausgegangen werden kann. Lediglich das PA Monocrotalin und das PANO Senecionin-N-Oxid wiesen in den Joghurtproben deutlich geringere relative Anteile des Gehalts von $57,3 \pm 16,9 \%$ bzw. $27,2 \pm 11,2 \%$ gegenüber der Ausgangsmilch auf. Diese relativen Anteile des Gehalts waren ebenfalls im Vergleich zu den in den Milchgelproben bestimmten relativen Anteile des Gehalts verringert. Insgesamt waren die SD im Probenmaterial Joghurt höher als für das chemisch gesäuerte Kontrollprodukt Milchgel.

Während der Senecionin-*N*-Oxid-Gehalt im Joghurt deutlich abgenommen hatte, wurde das korrespondierende PA Senecionin im Joghurt bestimmt. Die Bildung von Senecionin wurde durch den Vergleich mit einem Referenzstandard bestätigt. Der relative Anteil des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch war im Milchgel $77,9 \pm 7,9 \%$. Die Daten legen somit eine Reduktion des PANO zum PA durch die Starterkulturen nahe.

B. Natürlich kontaminierter Joghurt

Die aus den Transferversuchen mit Rindern erhaltene natürlich kontaminierte Milch wurde nach dem gleichen Herstellungsprotokoll wie die künstlich kontaminierte Kuhmilch zu Joghurt und Milchgel verarbeitet. Aufgrund der natürlichen Kontamination mit PA/PANO konnte zusätzlich der Einfluss des Erhitzungsvorgang der Milch in Vorbereitung auf die Joghurtherstellung untersucht werden. Der PA/PANO-Gesamtgehalt in der Rohmilch betrug $102,9 \pm 4,9 \%$ des Gehalts in der hochehitzten Joghurtmilch, die als Referenz (Ausgangsmilch) für alle Herstellungsprozesse als diente. Der PA/PANO-Gesamtgehalt wurde durch die Homogenisierung (60 °C, 250/50 bar) und anschließende Hochehitzung (92 °C, 300 s) nicht beeinflusst. Insgesamt wurden in der natürlich kontaminierten Rohmilch, sowie in der hochehitzten Joghurtmilch (Ausgangsmilch) Jacolin, Jacobin, Jaconin und Jacobin-*N*-Oxid über LOQ bestimmt. Diese vier PA/PANO wurden auch im Joghurt über LOQ nachgewiesen. Im Milchgel wurde zusätzlich Jacolin-*N*-Oxid über LOQ detektiert.

Im Joghurt wurde nach der Reifung ein relativer Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts von $80,7 \pm 6,3 \%$ gegenüber der Ausgangsmilch (hochehitzte Joghurtmilch) der jeweiligen Charge bestimmt (Abbildung 9).

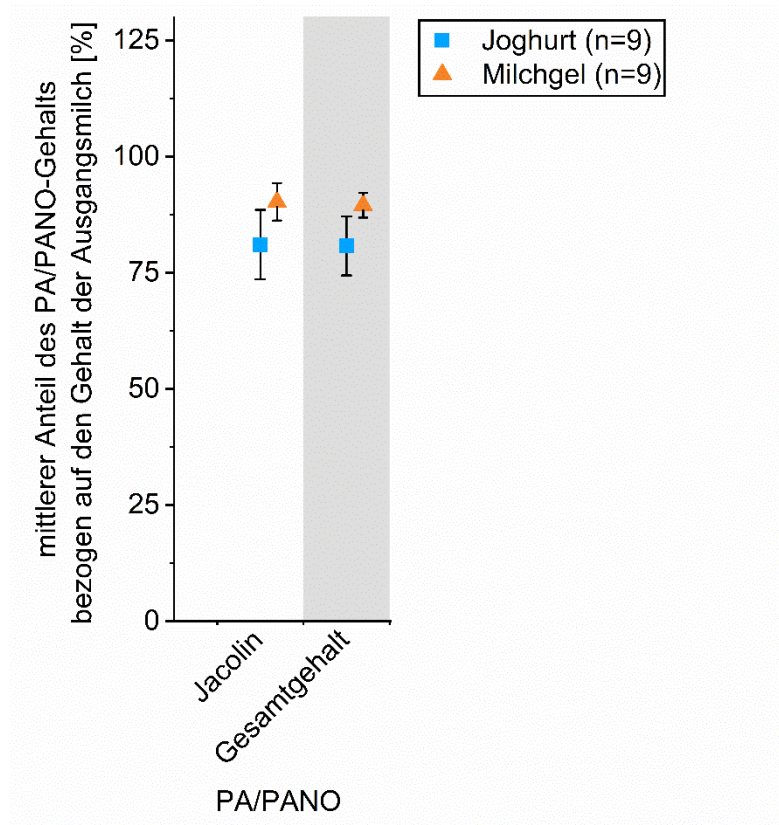


Abbildung 9: Pyrrolizidinalkaloide und -N-Oxide (PA/PANO) in Joghurt aus natürlich kontaminierter Kuhmilch: Relativer Anteil des Gehalts der bestimmten PA/PANO bezogen auf den in der jeweiligen hocherhitzten Milch bestimmten PA/PANO-Gehalt für die Produkte Joghurt (blau, aus $i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern, insgesamt $n = 9$ Proben) und Milchgel (orange, aus $i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern, insgesamt $n = 9$ Proben) aus Kuhmilch. Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der hocherhitzten Milch der jeweiligen Charge bezogen und anschließend gemittelt.

In der Ausgangsmilch war Jacolin mit einem relativen Anteil von 80 - 81 % am PA/PANO-Gesamtgehalt der Hauptanalyt im PA/PANO-Profil. Im Joghurt lag der relative Anteil des Jacolin-Gehalts bei $81,1 \pm 7,5$ % bezogen auf die Ausgangsmilch. Dieser stimmt somit mit dem relativen Jacolin-Anteil bezogen auf die Ausgangsmilch überein, welcher im Rahmen der künstlichen Kontamination von Joghurt aus Kuhmilch ermittelt wurde. Im Gegensatz zur Joghurtherstellung aus künstlich kontaminierter Kuhmilch war bei der Joghurtherstellung aus natürlich kontaminierter Kuhmilch der relative Anteil des Jacolin-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch für Milchgel gering erniedrigt gegenüber dem Joghurt. Der relative Anteil des Jacolin-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch war im Milchgel $90,6 \pm 4,0$ %.

Durch den hohen Anteil von Jacolin am PA/PANO-Gesamtgehalt in der Ausgangsmilch war auch der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts bezogen auf die Ausgangsmilch im Milchgel gegenüber dem Joghurt erniedrigt.

Der Anteil von Jacolin am PA/PANO-Gesamtgehalt war auch nach der Fermentation konstant zwischen 79 - 83 % ($i=3$ Chargen mit je $m=3$ Bechern).

PA/PANO in Schnittkäse Typ Edamer aus Kuhmilch sowie dessen Prozessstufen

A. Künstlich kontaminierter Schnittkäse Typ Edamer

Unter der Einschränkung der semiquantitativen Bestimmung (4.2.3.1.), konnten lediglich erhebliche Änderungen im relativen Anteil des PA/PANO-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) während der Herstellung von Schnittkäse des Typs Edamer eingeordnet werden.

Über die unterschiedlichen PA hinweg wurde im finalen Produkt (Käse nach 56 Tagen Reifung) insgesamt eine Tendenz zu einem verringerten relativen Anteil des PA-Gehalts um etwa die Hälfte bezogen auf die Ausgangsmilch beobachtet. Der relative Anteil des PA-Gehalts in den Proben Molke, Molke nach dem Pressen, Käsebruch und Käse nach dem Salzbad war vergleichbar mit den Werten der Ausgangsmilch. Im Salzbad nach der Käseentnahme wurden ein geringer relativer Anteil des PA-Gehalts im Vergleich zur Ausgangsmilch nachgewiesen.

Wie für den Joghurt aus Kuhmilch wurde auch bei der Herstellung des Schnittkäse Typ Edamer eine deutliche Verringerung des relativen Anteils des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts bereits ab Beginn der Herstellung beobachtet. Der relative Anteil des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts in der Molkeprobe war jedoch vergleichbar mit den Werten der Ausgangsmilch. In den Proben Käsebruch und Molke nach dem Pressen war der relative Anteil des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts bereits um etwa die Hälfte gesunken. Aufgrund der komplexen Probenmatrices konnte die Anwesenheit von Senecionin bei Abbau von Senecionin-*N*-Oxid nur qualitativ bestätigt werden.

B. Natürlich kontaminierter Schnittkäse Typ Edamer

In der natürlich kontaminierten Milch, welche aus den Transferstudien mit Rindern gewonnen wurde, trägt Jacolin einen sehr hohen Anteil am PA/PANO-Gesamtgehalt bei. Folglich werden die Veränderung des PA/PANO-Gesamtgehalts in hohem Maß von dem Verbleib von Jacolin während der Prozessierung der Milch beeinflusst. Unter der Einschränkung der semiquantitativen Bestimmung (4.2.3.1.), konnten nur erhebliche Änderungen im relativen Anteil des PA/PANO- bzw. des Jacolin-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) während der Herstellung von Schnittkäse des Typs Edamer eingeordnet werden.

Sowohl der relative Anteil des Jacolin-Gehalts als auch der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts bezogen auf die Ausgangsmilch war zwischen den unterschiedlichen Stoffströmen (Käsebruch, Molke, Molke nach dem Pressen) während der Herstellung des Schnittkäses Typ Edamer bis zum Käse nach dem Salzbad vergleichbar. Nach 56 Tagen Reifung war eine Tendenz zur Abnahme zu einem verringerten relativen Anteil des PA-Gehalts um etwa die Hälfte bezogen auf die Ausgangsmilch erkennbar. Im Salzbad wurde Jacolin in Spuren bestimmt.

Zusätzlich wurde für die natürlich kontaminierte Milch auch der Einfluss des Erhitzungsprozesses zur Herstellung von pasteurisierter Kesselmilch aus Rohmilch untersucht. Hierbei war der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts sowie des Jacolin-Gehalts allein vergleichbar mit der pasteurisierten Kesselmilch (Ausgangsmilch). Die Daten weisen somit daraufhin, dass Jacolin durch die Bedingungen während der Pasteurisierung, wie diese in Vorbereitung auf die Herstellung von Schnittkäse des Typs Edamer erfolgt, nicht beeinflusst wird.

4.2.3.2. PA/PANO-Analytik der Probensets Joghurt, Weichkäse Typ Picodon, Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego aus natürlich und künstlich kontaminierter Ziegen- und Schafmilch

Auf Grund der hohen Komplexität der Proben und den gewonnenen Erkenntnissen aus den Untersuchungen der Probensets Schnittkäse Typ Edamer und Joghurt aus Kuhmilch (4.2.3.1.) erfolgte zur Analyse der PA/PANO in Milchprodukten, hergestellt aus der Milch von kleinen Wiederkäuern, zunächst eine Methodenoptimierung (3.2.3.2.).

Methodenoptimierung und -validierung für das Probenet Joghurt aus Ziegenmilch

Die Ziegen hatten in der Transferstudie höhere Extrakt-Dosierungen als die Rinder erhalten, das hatte höhere PA/PANO-Gehalte in der Milch für die Joghurtherstellung zur Folge. Die Ergebnisse des Probensets Joghurt aus Kuhmilch zeigen, dass auch für die künstlich kontaminierten Proben gut nachweisbare PA/PANO-Gehalte vorhanden waren. Somit war es im Weiteren für das Probenet Joghurt aus Ziegenmilch möglich bei der Rekonstitution, nach dem Abdampfen unter Stickstoff, das Aufnahmeverolumen von 500 µL auf 1000 µL zu erhöhen. Das führte auch zu einer Verdünnung der enthaltenen Matrix, was sich positiv auf die Messqualität auswirkte. Die Methode für die PA/PANO-Analytik der Proben des Probensets Joghurt aus Ziegenmilch wurde mittels Blindmaterials, welches an der LMU im kleinen Labormaßstab hergestellt wurde, validiert. Das Blindmaterial wurde in Anlehnung an die Herstellung des Joghurts und des Milchgels aus Ziegenmilch (3.2.1.1.) mit entsprechender Anpassung an den Labormaßstab hergestellt.

Für die Methodenvvalidierung wurde das Blindmaterial im Fünffachansatz zu je 0,2, 0,75 und 4,5 µg/L dotiert und gemäß der optimierten Methode analysiert.

Die Ergebnisse der Validierung zu den Matrices Joghurt und Milchgel sind in Tabelle 13 dargestellt. Für 36 der 39 evaluierten PA/PANO war die WFR in der Matrix Joghurt aus Ziegenmilch zwischen 59,7 % (Jaconin) und 114,6 % (Sceleratin-*N*-Oxid) mit einer RSD zwischen 2,0 % (Integerrimin-*N*-Oxid) und 18,7 % (Erucifolin-*N*-Oxid). Der Median der WFR sowie des RSD lag für diese 36 PA/PANO bei 93,1 % bzw. 7,5 %. Für die gleichen 36 PA/PANO war die WFR in der Matrix Milchgel aus Ziegenmilch zwischen 51,7 % (Jaconin) und 114,4 % (Jacobin) mit einer RSD zwischen 1,4 % (Spartioidin) und 33,2 % (Merenskin). Der Median der WFR sowie des RSD lag für diese 36 PA/PANO bei 90,8 % bzw. 6,9 %.

Merenskin-*N*-Oxid, Merepoxin-*N*-Oxid und Riddelliin-*N*-Oxid, welche bereits nur semiquantitativ in der Milch bestimmbar waren (Klein et al. 2022), waren auch in den Matrices Joghurt und Milchgel aus Ziegenmilch eingeschränkt durch eine sehr geringe bzw. hohe WFR nur semiquantitativ bestimmbar (Tabelle 13).

Für die Linearität der Messmethode wurden R^2 -Werte von $> 0,99$ für alle Analyten in beiden Matrices (Joghurt und Milchgel) ermittelt (Tabelle 13). LOQ war für alle PA/PANO, mit wenigen Ausnahmen, 0,2 µg/L (Tabelle 13). Dies entsprach der Konzentration des kleinsten Kalibrierstandards der Probenmessungen bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial, bei der ein Signal-Rauschverhältnis von > 10 für den Quantifier und ein Signal-Rauschverhältnis von > 3 für den Qualifier bestimmt wurde.

Tabelle 13: Überblick über die Validierungsdaten der Methodik für die Bestimmung des Pyrrolizidinalkaloid (PA) /PA-*N*-Oxid (PANO) -Gehalts in den Proben des Joghurt-Sets aus Ziegenmilch. Durchschnittliche Wiederfindungsraten (WFR) und Wiederholbarkeit (ausgedrückt als relative Standardabweichung, RSD_r) bei drei Dotierungsstufen mit $n = 5$ Wiederholungen und Bestimmungsgrenze (LOQ). Der Kalibrierbereich für die Validierung war 0,1 - 9 µg/L ($n = 6$ Punkte) bezogen auf das Probenmaterial. LOQ, WFR und RSD wurden jeweils auf eine Nachkommastelle gerundet.

	Joghurt								Milchgel							
		Dotierung 0,2 µg/L		Dotierung 0,8 µg/L		Dotierung 4,5 µg/L				Dotierung 0,2 µg/L		Dotierung 0,8 µg/L		Dotierung 4,5 µg/L		
PA/PANO	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R^2	LOQ [µg/L]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R^2
Echimidin	0,2	100,2	5,7	91,8	6,6	91,0	3,2	0,9997	0,2	90,8	7,6	82,8	2,3	95,1	8,0	0,9994
Echimidin- <i>N</i> -Oxid	0,2	97,8	7,8	87,9	4,7	94,9	6,7	0,9913	0,2	93,0	3,6	84,6	6,2	92,2	8,4	0,9987
Erucifolin	0,9	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	88,2	5,2	0,9995 ^a	0,2	88,6	10,5	80,8	5,0	93,2	10,0	0,9996
Erucifolin- <i>N</i> -Oxid	0,2	90,6	17,4	94,0	7,8	82,3	18,7	0,9942	0,2	101,2	8,6	90,9	3,8	98,3	8,5	0,9909
Heliotrin	0,2	99,9	7,6	86,0	5,1	89,7	4,0	0,9976	0,2	92,9	4,6	81,4	5,0	93,9	8,4	0,9994
Heliotrin- <i>N</i> -Oxid	0,2	97,2	7,5	98,8	5,3	101,4	4,3	0,9994	0,2	103,5	3,0	89,9	1,5	97,3	1,9	0,9982
Integerrimin	0,2	94,7	3,1	86,6	6,0	90,9	6,9	0,9978	0,2	87,8	9,1	79,8	3,4	93,9	9,3	0,9985
Integerrimin- <i>N</i> -Oxid	0,2	102,3	2,0	96,8	6,6	97,9	3,7	0,9978	0,2	105,5	10,7	90,6	6,1	100,6	3,7	0,9986
Jacobin	0,2	101,5	12,3	98,5	6,3	100,9	3,6	0,9943	0,2	105,8	8,8	98,7	5,3	114,4	7,9	0,9994
Jacobin- <i>N</i> -Oxid	0,2	102,3	12,4	89,1	9,3	99,4	4,7	0,9970	0,2	96,2	6,0	89,6	6,8	91,5	5,5	0,9990
Jacolin	0,2	87,8	10,8	87,7	10,0	91,7	6,6	0,9954	0,2	89,3	9,4	85,3	4,7	96,5	8,5	0,9940
Jacolin- <i>N</i> -Oxid	0,2	95,4	15,4	89,3	13,0	93,7	16,2	0,9998 ^b	0,2	97,7	6,3	90,2	7,0	96,0	7,9	0,9934
Jaconin	0,2	74,7	9,1	65,7	17,4	75,8	11,6	0,9930	0,2	52,7	23,4	51,7	9,3	57,6	18,1	0,9998
Lasiocarpin	0,2	104,0	10,4	97,5	6,4	93,8	7,5	0,9981	0,2	83,4	18,0	74,8	8,9	93,4	17,6	0,9941 ^c
Lasiocarpin- <i>N</i> -Oxid	0,2	101,6	7,3	88,5	5,9	94,7	6,2	0,9942	0,2	93,2	8,7	82,0	9,3	95,7	7,9	0,9908
Lycopsamin	0,2	89,0	10,6	85,0	11,0	87,6	3,7	0,9966	0,2	102,8	7,1	93,4	7,5	98,1	7,3	0,9992
Lycopsamin- <i>N</i> -Oxid	0,2	100,2	12,7	94,8	4,0	95,5	10,6	0,9982	0,2	100,3	2,3	90,7	1,9	95,8	5,5	0,9961
Merenskin	0,2	96,5	13,2	81,5	13,4	92,5	12,5	0,9980	0,2	62,9	33,2	55,3	17,8	70,5	12,8	0,9986 ^a
Merenskin- <i>N</i> -Oxid	0,2	10,1	139,2	15,4	31,1	18,4	45,4	0,9993	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	22,9	35,0	0,9999

n.b.: nicht bestimmbar

^a niedrigster Kalibrierstandard war 0,5 µg/L, $n = 5$

^b $n = 5$

^c höchster verwendeter Kalibrierstandard war 6,8 µg/L, $n = 5$

Tabelle 13: Fortsetzung

PA/PANO	Joghurt								Milchgel							
	LOQ [µg/L]	Dotierung 0,2 µg/L		Dotierung 0,8 µg/L		Dotierung 4,5 µg/L		R^2	LOQ [µg/L]	Dotierung 0,2 µg/L		Dotierung 0,8 µg/L		Dotierung 4,5 µg/L		R^2
		WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]			WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	
Merepoxin	0,2	98,6	8,2	90,8	5,6	90,4	10,7	0,9971	0,2	105,0	17,7	88,7	9,8	101,9	9,0	0,9919 ^a
Merepoxin- <i>N</i> -Oxid	0,2	136,4	8,7	134,7	11,5	136,2	9,1	0,9969	0,2	160,6	14,2	142,3	7,4	153,4	8,2	0,9942 ^c
Monocrotalin	0,2	90,5	13,3	87,9	9,1	97,2	10,6	0,9996	0,2	83,8	12,9	79,7	2,7	91,3	6,1	0,9996
Monocrotalin- <i>N</i> -Oxid	0,2	112,2	16,9	92,9	12,6	107,9	16,7	0,9952	0,2	92,7	6,9	87,6	3,7	94,7	6,0	0,9970
Retrorsin	0,9	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	91,8	3,9	0,9990 ^a	0,2	89,5	6,4	80,0	5,0	91,0	7,9	0,9988
Retrorsin- <i>N</i> -Oxid	0,2	96,4	8,1	102,9	5,3	104,2	5,2	0,9969	0,2	99,9	7,9	89,6	6,3	101,6	5,7	0,9970
Riddelliin	0,9	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	76,9	4,7	0,9967	0,2	75,9	6,8	66,9	4,6	76,9	11,0	0,9998 ^a
Riddelliin- <i>N</i> -Oxid	0,2	32,0	20,6	35,2	12,8	34,6	8,8	0,9976	0,2	31,5	17,7	30,4	11,1	33,7	13,2	0,9991
Sceleratin	0,2	98,6	9,3	88,1	7,8	99,7	6,8	0,9914	0,2	98,6	8,1	90,7	9,5	100,2	3,0	0,9916
Sceleratin- <i>N</i> -Oxid	0,2	111,1	18,2	114,6	14,8	114,1	2,1	0,9926	0,2	109,5	9,5	98,2	4,2	106,4	10,1	0,9999 ^a
Senecionin	0,2	97,3	5,6	88,8	6,2	93,3	4,5	0,9990	0,2	86,8	7,0	78,0	2,9	92,1	10,5	0,9998
Senecionin- <i>N</i> -Oxid	0,2	91,4	11,2	88,6	9,1	97,2	7,8	0,9979	0,2	107,6	12,1	92,4	2,7	101,2	4,2	0,9991
Seneciphyllin	0,2	107,3	5,5	88,4	3,7	87,9	5,5	0,9996	0,2	78,3	6,1	69,3	2,4	83,6	6,7	0,9994
Seneciphyllin- <i>N</i> -Oxid	0,2	63,5	10,9	59,7	6,7	64,5	9,4	0,9932	0,2	69,2	4,3	61,3	6,3	67,5	6,3	0,9938
Senecivernin	0,2	97,7	6,7	88,3	6,4	91,1	8,6	0,9983	0,2	82,0	5,5	75,2	5,7	89,1	8,5	0,9996
Senecivernin- <i>N</i> -Oxid	0,2	98,9	17,9	88,7	5,2	89,0	8,1	0,9987	0,2	101,3	12,2	90,9	10,0	102,0	4,6	0,9928
Senkirkin	0,2	95,1	17,8	88,8	7,9	94,0	5,5	0,9984	0,2	87,5	7,5	84,1	6,6	98,7	2,8	0,9952
Spartoidin	0,2	94,7	18,0	91,0	5,4	87,4	3,7	0,9988	0,2	77,0	9,3	69,1	1,4	79,5	7,5	0,9992
Usaramin	0,2	98,4	12,1	90,4	5,0	93,9	4,9	0,9981	0,2	89,2	4,3	79,9	5,8	90,4	8,8	0,9995
Usaramin- <i>N</i> -Oxid	0,2	84,7	11,5	92,9	5,0	90,6	8,8	0,9994	0,2	94,1	10,5	88,4	3,4	94,6	4,7	0,9944

n.b.: nicht bestimmbar

^a niedrigster Kalibrierstandard war 0,5 µg/L, $n = 5$ ^b $n = 5$ ^c höchster verwendeter Kalibrierstandard war 6,8 µg/L, $n = 5$

PA/PANO in Joghurt aus Ziegenmilch sowie dessen Prozessstufen

A. Künstlich kontaminierter Joghurt

Die zehn eingesetzten PA wiesen im Joghurt aus künstlich kontaminierter Ziegenmilch relative Anteile des Gehalts von $90,4 \pm 5,4 \%$ bis $142,2 \pm 3,3 \%$ bezogen auf die jeweilige Ausgangsmilch (hocherhitzte Joghurtmilch) auf (Abbildung 10). Im Kontrast dazu zeigte sich für das PANO Senecionin-*N*-Oxid im Joghurt mit einem relativen Anteil des Gehalts von $40 \pm 5 \%$ bezogen auf die Ausgangsmilch eine deutliche Verringerung.

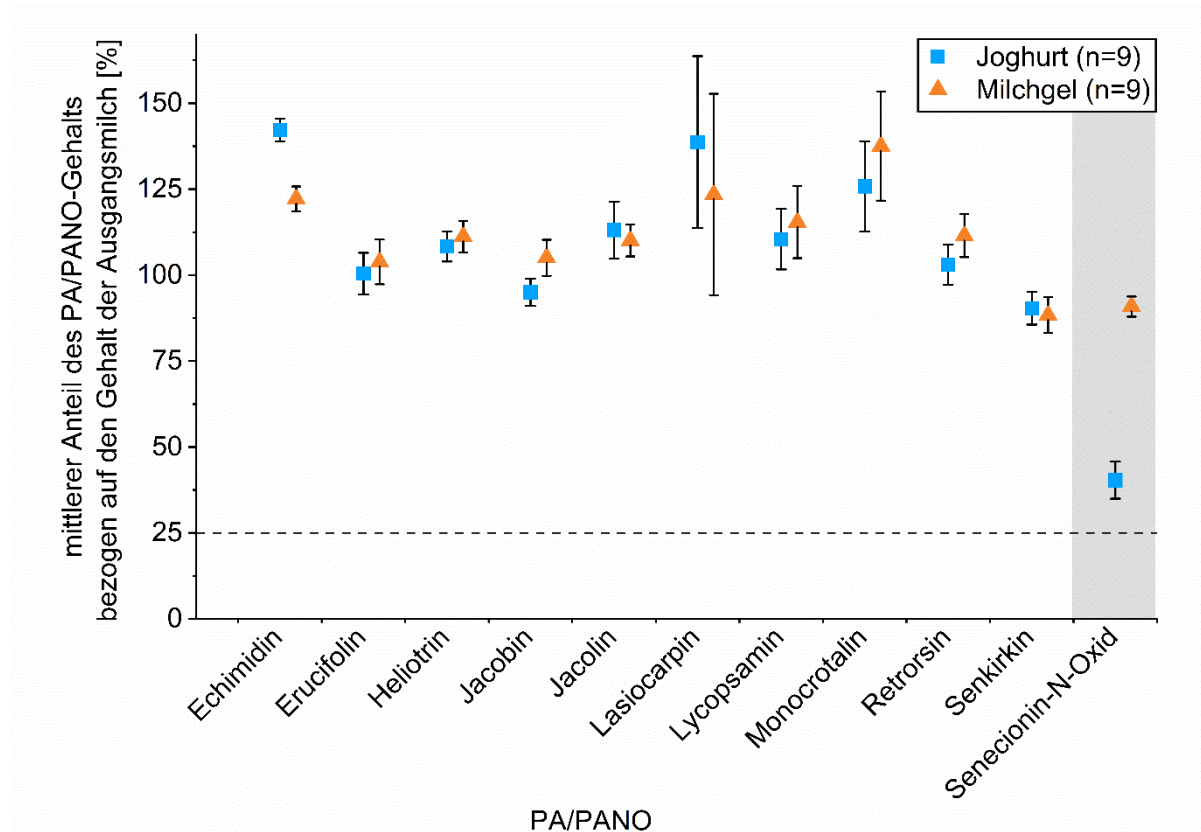


Abbildung 10: Pyrrolizidinalkaloide und -*N*-Oxide (PA/PANO) in Joghurt aus künstlich kontaminierter Ziegenmilch: Relativer Anteil des Gehalts der eingesetzten PA/PANO bezogen auf den Gehalt der dotierten Ausgangsmilch (hocherhitzte Joghurtmilch) für die Produkte Joghurt (blau, aus $i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern, insgesamt $n = 9$ Proben) und Milchgel (orange, aus $i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern, insgesamt $n = 9$ Proben). Die PA/PANO Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der eingesetzten dotierten Milch der jeweiligen Charge bezogen und anschließend gemittelt.

Für sieben der zehn eingesetzten PA war der relative Anteil des Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch in dem fermentierten Produkt Joghurt und der chemisch gesäuerten Kontrolle Milchgel vergleichbar (Abbildung 10). Die relativen Anteile des Gehalts waren für Jacobin und Retrorsin im Joghurt gegenüber dem Milchgel erniedrigt. Echimidin zeigte einen höheren relativen Anteil des Gehalts im Joghurt gegenüber dem Milchgel.

Während der relative Anteil des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch im Joghurt stark verringert war, wurde im Milchgel ein relativer Anteil des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts von $91,3 \pm 2,9$ % detektiert (Abbildung 10). Mit der Abnahme des relativen Anteils des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts wurde eine Zunahme des korrespondierenden PA Senecionin beobachtet (Abbildung 11). Unter Berücksichtigung der jeweiligen molaren Masse waren 62 - 71 % des Verlusts an Senecionin-*N*-Oxid mit dem Anstieg an Senecionin erklärbar.

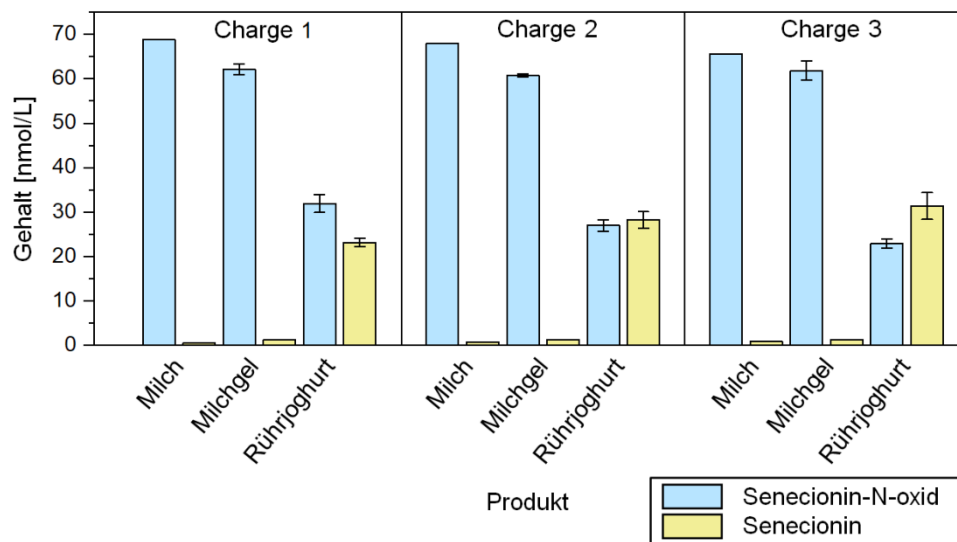


Abbildung 11: Senecionin-*N*-Oxid und Senecionin in Joghurt aus Ziegenmilch: Senecionin-*N*-Oxid- und Senecionin-Gehalt [nmol/L] in der dotierten Ausgangsmilch (hoherhitzte Joghurtmilch) und den Produkten ($m = 3$ Becher) der einzelnen Charges ($i = 3$) bei der Joghurtherstellung aus Ziegenmilch.

Der molare Summengehalt von Senecionin-*N*-Oxid und Senecionin im Joghurt entsprach 80 - 82 % des molaren Summengehaltes von Senecionin-*N*-Oxid und Senecionin in der jeweiligen Ausgangsmilch. Die Daten legen somit eine mikrobielle Reduktion des PANO zum PA durch die Starterkulturen nahe, da diese Umwandlung nicht bei chemischer Säuerung der Milch (Milchgel) beobachtet wurde.

Für die Mehrzahl der eingesetzten PA wurde kein mikrobieller Einfluss der Starterkultur (Milchsäurebakterien) auf den Verbleib von PA im Produkt beobachtet. Diese Daten deuten darauf hin, dass bei den PA nicht von einer relevanten Verringerung des relativen Anteils des PA-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch durch die Herstellung von Joghurt aus kontaminierter Milch ausgegangen werden kann.

Insgesamt bestätigen die Daten die Ergebnisse zur Verarbeitung von künstlich kontaminierter Ziegenmilch zu Joghurt und Milchgel (4.2.3.1.).

B. Natürlich kontaminierter Joghurt

Die natürlich kontaminierte Ziegenrohmlach wurde nach dem gleichen Herstellungsprotokoll wie die künstlich kontaminierte Ziegenmilch zu Joghurt und Milchgel verarbeitet. Aufgrund der natürlichen Kontamination mit PA/PANO konnte auch der Einfluss des Erhitzungsvorgang der Milch in Vorbereitung auf die Joghurtherstellung untersucht werden. Der PA/PANO-Gesamtgehalt in der Rohmilch betrug $115,3 \pm 2,1$ % des Gehalts in der hocharhitzten Joghurtmilch, die als Referenz (Ausgangsmilch) für alle Herstellungsprozesse als diente. Durch die Homogenisierung (60 °C, 250/50 bar) und anschließende Hocharhitzung (92 °C, 300 s) wurde somit der ermittelte PA/PANO-Gesamtgehalt gering reduziert.

Insgesamt wurden in der natürlich kontaminierten Rohmilch und in der hocharhitzten Joghurtmilch (Ausgangsmilch) Jacolin, Jacobin, Jaconin, Jacobin-N-Oxid, Jacolin-N-Oxid und Retrorsin mit Gehalten über LOQ bestimmt. Diese sechs PA/PANO wurden ebenfalls im Joghurt und im Milchgel über LOQ nachgewiesen. Im Joghurt wurde nach der Reifung ein relativer Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts von $109,2 \pm 4,1$ % bezogen auf die Ausgangsmilch (hocharhitzte Joghurtmilch) der jeweiligen Charge nachgewiesen (Abbildung 12).

Jacolin war in den Milchproben der Transferversuche stets der Hauptanalyt und lag mit dem höchsten Anteil am Gesamt-PA/PANO-Gehalt im Vergleich zu den anderen enthaltenen PA/PANO vor. Bei Jacolin kam es zu keiner Verringerung des relativen Anteils des Gehaltes im Joghurt bezogen auf die Ausgangsmilch. Es waren im Joghurt noch $110,6\% \pm 4,1\%$ des Gehaltes der Ausgangsmilch vorhanden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten für Jacolin, welche im Rahmen der Joghurtherstellung mit künstlich kontaminierter Ziegenmilch als Ausgangsmilch ermittelt wurden, überein.

Im Gegensatz zur Joghurtherstellung aus künstlich kontaminierter Ziegenmilch wurde bei der Joghurtherstellung aus natürlich kontaminierter Ziegenmilch ein Unterschied im relativen Anteil des Jacolin-Gehalts des Joghurts und des Milchgels bezogen auf die Ausgangsmilch ermittelt. Das Milchgel hatte einen relativen Anteil des Jacolin-Gehalts von $87,0 \pm 5,2$ % bezogen auf die Ausgangsmilch. Durch den hohen Anteil von Jacolin am PA/PANO-Gesamtgehalt (89 - 91 % in der Ausgangsmilch) war dieser Unterschied zwischen Joghurt und Milchgel ebenfalls für den relativen Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts bezogen auf die Ausgangsmilch sichtbar. Der relative Anteil von Jacolin am Gesamt-PA/PANO-Gehalt im Joghurt war zwischen 90-92 % ($i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern) und blieb damit konstant während der Herstellung.

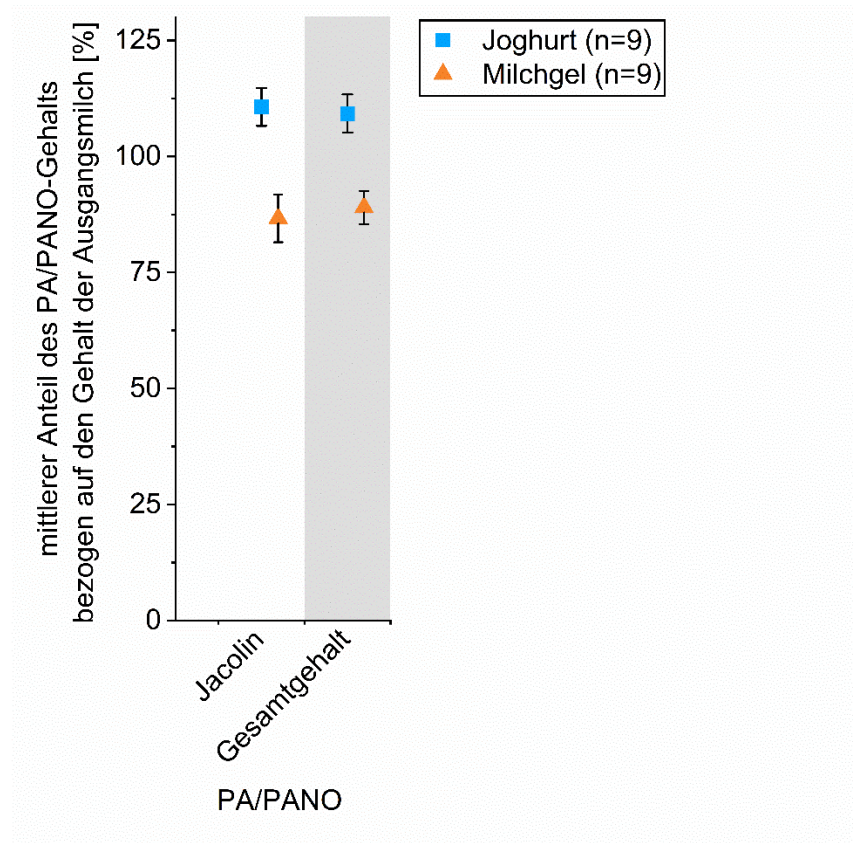


Abbildung 12: Pyrrolizidinalkaloide und -N-Oxide (PA/PANO) in Joghurt aus natürlich kontaminierter Ziegenmilch: Relativer Anteil des Gehalts der bestimmten PA/PANO bezogen auf den in der jeweiligen Ausgangsmilch (hocherhitze Joghurtmilch) bestimmten PA/PANO-Gehalt für die Produkte Joghurt (blau, aus $i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern, insgesamt $n = 9$ Proben) und Milchgel (orange, aus $i = 3$ Chargen mit je $m = 3$ Bechern, insgesamt $n = 9$ Proben). Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der hochehitzen Milch der jeweiligen Charge bezogen und anschließend gemittelt.

Methodenoptimierung und Validierung für die Probensets Weichkäse Typ Picodon, Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego aus Ziegen- und Schafmilch

Auf Grund der hohen Komplexität der Matrices, der unterschiedlichen Beschaffenheit der Proben sowie der Ergebnisse für den Schnittkäse Typ Edamer (4.2.3.1., 5.2.3.1.) wurde eine intensive Methodenoptimierung für die Bestimmung von PA/PANO in den Probensets der Käse aus der Milch von kleinen Wiederkäuern durchgeführt.

Für die Optimierung wurde die Methode für die Bestimmung von PA/PANO in Milch als Basis verwendet (3.1.2.2.; Klein et al. 2022). Zunächst wurden Kombinationen aus einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels verdünnter Ameisensäure und einer Extraktreinigung mittels Kationenaustauscher-Festphasenextraktion (SPE), sowie zusätzliche Reinigungsschritte (Zentrifugation, Filtration) getestet. Dadurch konnten jedoch in Summe für die Proben von Hartkäse Typ Manchego, Weichkäse Typ Picodon und Weichkäse Typ Feta keine ausreichende Reinigung der Probenextrakte erreicht werden, welche eine zuverlässige Bestimmung der PA/PANO erlauben würde (Daten nicht gezeigt).

Im Anschluss wurde eine Methodik in Anlehnung an das QuEChERS-Prinzip getestet (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*; dt.: schnell, einfach, kostengünstig, effektiv, robust und sicher). Der QuEChERS-Ansatz wurde bereits mehrfach für die Analytik von PA/PANO in anderen Lebensmittelmatrizes eingesetzt (Casado et al. 2022). Diese Vorgehensweise wurde zudem als Probenaufarbeitung für die Spurenanalytik von Mykotoxinen in Hart- und Weichkäse für die direkte Messung mittels LC-MS/MS oder in Kombination mit einem zusätzlichen Reinigungsschritt mittels Immunoaffinitätssäule angewendet (BfR 2021; Gützkow et al. 2023). Es stellte sich im Rahmen dieser Methodenoptimierung heraus, dass während der Probenextraktion mittels QuEChERS im Besonderen die PA/PANO, welche ein Chlor-Atom in ihrer Molekülstruktur aufweisen, z. B. Jaconin, instabil waren und somit analytisch nicht mehr erfassbar waren (keine quantitative oder qualitative Bestimmung möglich). Darüber hinaus ermöglichte es der QuEChERS-Ansatz nicht, die starken Matrixeffekte in den Messlösungen in ausreichendem Maß zu reduzieren und eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten.

In der final optimierten Probenaufarbeitung (3.2.3.2.) wurden die Proben mit wässriger Ameisensäure (0,2 %), *n*-Hexan und Glasperlen, zur Steigerung der Scherkräfte, durch Schütteln auf dem Horizontalschüttler extrahiert. Durch Zentrifugationsschritte und eine pH-Änderung in den alkalischen Bereich wurde eine Fällung und Abtrennung von groben Matrixbestandteilen erreicht. Im Anschluss wurde eine Festphasenextraktion mit Polymeric Reversed Phase-Kartuschen (StrataTM-XL 100 µm, 200 mg Bettmasse/6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) durchgeführt. Die Erhöhung der Porengröße in der stationären Phase von 33 µm auf 100 µm stellte ein konstantes Passieren des Probenextraktes durch die stationäre Phase sicher. Bei Verwendung der geringeren Porengröße (33 µm) war es häufig zum Verstopfen der Kartuschen gekommen, insbesondere bei den komplexen Proben zum Ende des Käseherstellung. Dies konnte nun erfolgreich optimiert werden.

Bei einer Porengröße von 100 µm wurde im Vergleich zur Porengröße 33 µm eine schwächere Interaktion am Umkehrphasen-SPE-Material beobachtet, insbesondere der Analyten, die eine hohe Zahl an Hydroxygruppen in den Seitenketten besitzen (z. B. Jacolin). Ein Waschen der beladenen Kartuschen mittels angesäuerten oder alkalischen Lösungen, wie dies beispielsweise von Mulder et al. (2018) mit Strata™-X (33 µm, 200 mg Bettmasse/6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) für die Bestimmung von PA/PANO in anderen Milchprodukten durchgeführt wurde, wurde in Kombination mit den Strata™-XL (100 µm, 200 mg Bettmasse/6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) getestet und führte zu stark reduzierten Wiederfindungsraten (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für den Waschschrift in der optimierten Methode ausschließlich Reinstwasser verwendet.

Besonders bei der Probenaufarbeitung sehr komplexer Proben (z.B. Weichkäse Typ Feta nach 56 Tagen Reifung und Hartkäse Typ Manchego nach dem Salzbad) waren nach Rekonstitution des abgedampften Rückstandes mit Methanol/Wasser (v,v, 10/90) in den Messlösungen unlösliche Matrixbestandteile enthalten. Diese waren nicht durch eine Membranfiltration (0,2 µm PVDF) entfernbare. In Folge wurden zwei weitere Zentrifugationsschritte in Kombination mit Ausfrieren bei -20 °C ergänzt. Insgesamt wurde somit eine zuverlässige Probenaufarbeitungsmethode für die Quantifizierung einer Vielzahl von PA/PANO in unterschiedlichen Käseprodukten und deren Prozessstufen entwickelt (3.2.3.2.).

Die Methode wurde für die finalen Produkte Weichkäse Typ Picodon, Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego sowie repräsentative Probenmatrices aus der Herstellung, validiert. Hierfür wurde Blindmaterial im Fünffachansatz zu je 2,5 und 10 µg/kg dotiert und analysiert (nur 2,5 µg/kg bei Feta nach 56 Tagen aufgrund von begrenzter Verfügbarkeit der Blindmaterialmenge). Die Daten der Validierung sind in den Tabellen 14 bis 16 aufgeführt. Die Wiederfindungsraten lagen für 35 von 39 PA/PANO in allen getesteten Probenmatrices im Bereich von 52,8 – 141,2 % mit einer RSD von 0,8 – 20,6 %.

In den validierten Probenmatrices des Sets Picodon waren die Wiederfindungsraten der PA/PANO, bis auf vereinzelte Abweichungen, jeweils vergleichbar (Tabelle 16). Jacolin wies über alle Probenmatrices hinweg eine deutlich verringerte Wiederfindungsrate (36,0 – 73,6 %) im Vergleich zu den weiteren PA/PANO auf (Tabellen 14 bis 16). Abhängig vom Dotierlevel und der Probenmatrix waren die RSD für Jacolin zwischen 5,7 und 38 %. Merenskin (Isomer von Jacolin) war in den Matrices Feta nach 56 Tagen Reifung und Picodon nach 21 Tagen Reifung aufgrund von Matrixinterferenzen nicht bestimmbar. Das PANO Merenskin-*N*-Oxid war aufgrund der stark verringerten Wiederfindungsraten mit durchgehenden hohen Standardabweichungen nicht bestimmbar. Das PANO Merepoxin-*N*-Oxid war aufgrund der stark erhöhten Wiederfindungsraten nur semiquantitativ bestimmbar (Tabellen 14 bis 16).

Für die Linearität der Messmethode wurden Bestimmtheitsmaße (R^2) von $> 0,99$ für alle PA/PANO in allen Matrices, mit vereinzelt Ausnahmen, ermittelt (Tabellen 14 bis 16).

LOQ der PA/PANO konnte für die Mehrheit aller Probenmatrices der drei Käsearten (Hartkäse Typ Manchego, Weichkäse Typ Picodon, Weichkäse Typ Feta) auf $0,8 \mu\text{g/kg}$ gesetzt werden. Vereinzelt musste LOQ höher angesetzt werden ($2,1 \mu\text{g/kg}$). Das war insbesondere für sehr komplexe Probenmatrices wie beispielsweise die gereiften Käseprodukte der Fall (Tabellen 14 bis 16). LOQ entsprach der Konzentration des kleinsten Kalibrierstandards bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial, bei der ein Signal-Rauschverhältnis von ≥ 6 für den Quantifier und ein Signal-Rauschverhältnis von > 3 für den Qualifier bestimmt wurde.

Tabelle 14: Überblick über die Validierungsdaten der Methodik für die Bestimmung des Pyrrolizidinalkaloid (PA) /PA-N-Oxid (PANO) -Gehalts in den Proben der Käse-Sets hergestellt aus Schafs- und Ziegenmilch (Teil I). Durchschnittliche Wiederfindungsraten (WFR) und Wiederholbarkeit (ausgedrückt als relative Standardabweichung, RSDr) bei zwei Dotierungsstufen mit $n = 5$ Wiederholungen, Bestimmungsgrenze (LOQ) und Bestimmtheitsmaß (R^2). Der Kalibrierbereich war 0,8 bis 16,7 µg/kg ($n = 6$ Punkte) bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial. LOQ, WFR und RSD wurden jeweils auf eine Nachkommastelle gerundet.

	Rohmilch (Schafmilch)						Molke (Weichkäse Typ Feta)						Salzbad nach Käseentnahme (Weichkäse Typ Feta)					
		Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg				Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg				Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg		
PA/PANO	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R^2	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R^2	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R^2
Echimidin	0,8	80,1	3,4	86,2	3,3	0,9975	0,8	92,8	3,3	91,7	2,6	0,9988	0,8	81,5	2,3	79,8	5,8	0,9989
Echimidin-N-Oxid	0,8	94,3	1,5	98,7	3,6	0,9989	0,8	92,7	4,5	95,8	4,1	0,9967	0,8	92,0	8,0	93,2	4,3	0,9954
Erucifolin	0,8	81,5	2,6	90,5	2,6	0,9999	0,8	86,8	3,7	93,0	3,3	0,9984 ^b	0,8	80,2	7,9	85,3	7,0	0,9829
Erucifolin-N-Oxid	0,8	97,2	3,6	100,5	3,5	0,9989	0,8	93,5	6,5	98,4	3,9	0,9934	0,8	95,8	7,9	94,8	6,6	0,9975 ^c
Heliotrin	0,8	83,5	4,9	94,6	5,6	0,9972	0,8	96,5	4,9	100,9	3,1	0,9953 ^b	0,8	85,1	8,2	87,3	3,3	0,9960
Heliotrin-N-Oxid	0,8	93,8	1,5	97,6	4,5	0,9994	0,8	96,2	6,4	100,4	3,5	0,9964	0,8	94,5	3,6	95,2	5,0	0,9989
Integerrimin	0,8	78,0	3,6	81,4	6,1	0,9997	0,8	86,2	4,2	87,0	2,5	0,9986	0,8	72,9	7,3	76,5	5,0	0,9985
Integerrimin-N-Oxid	0,8	96,6	3,2	104,0	3,7	0,9977	0,8	95,6	5,5	100,6	5,9	0,9973 ^c	0,8	101,6	7,7	101,0	5,9	0,9884
Jacobin	0,8	114,3	3,8	122,1	4,5	0,9996	0,8	110,2	4,3	126,1	6,2	0,9967 ^b	0,8	103,7	7,9	114,1	6,9	0,9958
Jacobin-N-Oxid	0,8	94,5	3,3	102,3	0,8	0,9985	0,8	91,8	4,9	94,5	3,6	0,9936	0,8	97,6	5,1	99,7	8,5	0,9950 ^c
Jacolin	0,8	86,9	3,4	95,5	5,0	0,9956	0,8	87,3	6,0	89,9	4,6	0,9974	0,8	89,6	3,8	88,7	8,2	0,9952 ^c
Jacolin-N-Oxid	0,8	92,0	4,2	96,5	5,4	0,9990	0,8	90,1	3,6	93,0	3,8	0,9986	0,8	97,1	15,8	99,3	19,7	0,9969 ^c
Jaconin	0,8	44,4	6,6	54,9	12,3	0,9996	0,8	57,7	5,7	48,7	11,0	0,9953	0,8	44,5	5,6	43,6	13,1	0,9975
Lasiocarpin	0,8	77,9	3,1	82,0	6,7	0,9977 ^a	0,8	98,8	7,0	89,4	9,1	0,9986 ^c	0,8	80,2	4,8	76,0	13,8	0,9972
Lasiocarpin-N-Oxid	0,8	93,5	2,7	100,2	1,6	0,9994	0,8	92,3	4,1	101,0	3,6	0,9966 ^b	0,8	94,0	4,7	97,6	4,1	0,9949
Lycopsamin	0,8	82,8	4,0	93,8	6,6	0,9965	0,8	87,8	3,6	93,2	4,7	0,9961	0,8	80,3	2,9	81,8	6,8	0,9937
Lycopsamin-N-Oxid	0,8	88,1	2,6	90,8	2,1	0,9989	0,8	95,6	3,0	93,8	5,2	0,9965	0,8	99,7	7,1	94,6	5,5	0,9933 ^c
Merenskin	0,8	62,4	6,8	70,0	6,4	0,9969	0,8	71,8	5,3	68,6	4,2	0,9932 ^b	0,8	63,6	9,0	63,9	9,1	0,9973
Merenskin-N-Oxid	0,8	14,1	18,8	19,7	30,2	0,9992	0,8	24,6	14,2	15,2	33,8	0,9976	0,8	23,2	12,7	24,4	32,8	0,9995

^a höchster verwendeter Kalibrierstandard war 8,3 µg/kg, $n = 4$

^b höchster verwendeter Kalibrierstandard war 12,5 µg/kg, $n = 5$

^c $n = 5$

Tabelle 14: Fortsetzung

	Rohmilch (Schafmilch)						Molke (Weichkäse Typ Feta)						Salzbad nach Käseentnahme (Weichkäse Typ Feta)					
		Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg				Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg				Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg		
PA/PANO	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R ²	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R ²	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R ²
Merepoxin	0,8	105,2	1,2	112,4	2,8	0,9996	0,8	107,0	7,1	122,7	4,9	0,9957 ^b	0,8	98,9	6,0	99,1	8,7	0,9927
Merepoxin- <i>N</i> -Oxid	0,8	181,4	2,2	183,8	6,1	0,9987	0,8	167,4	4,0	177,7	3,3	0,9968	0,8	151,9	7,5	159,3	8,4	0,9978
Monocrotalin	0,8	87,3	2,4	95,0	4,8	0,9987	0,8	87,0	4,9	90,0	4,7	0,9972	0,8	82,9	5,4	81,4	7,4	0,9992
Monocrotalin- <i>N</i> -Oxid	0,8	86,5	4,0	90,6	5,4	0,9992	0,8	87,5	2,4	87,5	6,1	0,9962	0,8	90,2	8,1	92,0	8,6	0,9965 ^c
Retrorsin	0,8	81,7	2,5	90,4	4,3	0,9997	0,8	80,9	6,3	87,7	7,0	0,9952	0,8	79,7	2,5	78,3	4,8	0,9892
Retrorsin- <i>N</i> -Oxid	0,8	94,1	2,6	102,0	2,3	0,9987	0,8	92,7	7,2	98,7	4,3	0,9955	0,8	94,0	6,1	94,1	4,8	0,9980
Riddelliin	0,8	82,2	5,1	89,5	3,3	0,9997	0,8	86,3	4,5	92,2	2,1	0,9971 ^b	0,8	80,5	5,0	79,1	4,7	0,9986
Riddelliin- <i>N</i> -Oxid	0,8	86,7	3,1	94,8	3,7	0,9986	0,8	88,8	5,1	90,7	3,6	0,9941	0,8	87,0	6,0	84,4	7,6	0,9897
Sceleratin	0,8	89,8	2,5	95,4	3,7	0,9989	0,8	92,6	6,5	95,1	6,4	0,9955	0,8	88,2	3,3	85,5	5,5	0,9968
Sceleratin- <i>N</i> -Oxid	0,8	101,6	3,3	102,2	5,3	0,9946	0,8	91,8	5,0	92,2	4,8	0,9993 ^c	0,8	104,2	14,6	101,5	13,1	0,9976
Senecionin	0,8	76,2	1,6	82,6	4,0	0,9987	0,8	84,5	5,7	87,0	1,0	0,9994	0,8	71,9	4,0	75,5	5,3	0,9993
Senecionin- <i>N</i> -Oxid	0,8	98,6	6,6	100,4	3,9	0,9997	0,8	95,9	6,3	102,6	3,8	0,9937	0,8	100,4	2,7	102,7	9,1	0,9924
Seneciphyllin	0,8	77,9	2,7	86,0	5,1	0,9998	0,8	86,4	2,1	89,3	3,6	0,9966	0,8	74,5	4,0	77,4	6,0	0,9964
Seneciphyllin- <i>N</i> -Oxid	0,8	91,3	5,7	98,0	1,6	0,9998	0,8	93,6	5,4	94,7	5,1	0,9990	0,8	90,5	3,6	87,3	6,4	0,9991
Senecivernin	0,8	70,7	6,7	66,4	1,2	0,9878	0,8	86,6	4,2	88,1	5,1	0,9989 ^c	0,8	73,4	9,6	75,1	4,9	0,9971
Senecivernin- <i>N</i> -Oxid	0,8	89,9	4,2	97,2	2,0	0,9988	0,8	92,0	9,2	101,2	8,2	0,9940	0,8	91,0	5,4	92,1	3,7	0,9935
Senkirkin	0,8	86,9	4,9	95,1	3,1	0,9984	0,8	93,1	3,6	93,6	8,5	0,9971 ^c	0,8	85,1	5,9	85,0	7,8	0,9978
Spartioidin	0,8	78,6	3,3	85,6	7,7	0,9988	0,8	85,1	1,2	88,3	2,1	0,9970	0,8	75,2	2,3	82,1	4,5	0,9963
Usaramin	0,8	83,8	2,9	91,1	3,1	0,9992	0,8	86,0	1,4	87,4	1,7	0,9894	0,8	81,8	6,1	82,5	5,0	0,9972
Usaramin- <i>N</i> -Oxid	0,8	98,1	1,7	100,1	2,4	0,9991	0,8	94,4	5,1	96,0	2,3	0,9991	0,8	87,7	12,6	93,1	4,6	0,9852

^a höchster verwendeter Kalibrierstandard war 8,3 µg/kg, n = 4^b höchster verwendeter Kalibrierstandard war 12,5 µg/kg, n = 5^c n = 5

Tabelle 15: Überblick über die Validierungsdaten der Methodik für die Bestimmung des Pyrrolizidinalkaloid (PA) /PA-*N*-Oxid (PANO) -Gehalts in den Proben der Käse-Sets hergestellt aus Schafs- und Ziegenmilch (Teil II). Durchschnittliche Wiederfindungsraten (WFR) und Wiederholbarkeit (ausgedrückt als relative Standardabweichung, RSD_r) bei zwei Dotierungsstufen mit *n* = 5 Wiederholungen, Bestimmungsgrenze (LOQ) und Bestimmtheitsmaß (*R*²). Der Kalibrierbereich war 0,8 bis 16,7 µg/kg (*n* = 6 Punkte) bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial.

	Käse nach 56 Tagen Reifung (Weichkäse Typ Feta)				Käse nach 112 Tagen (Schnittkäse Typ Manchego)					
		Dotierung 2,5 µg/kg				Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg		
PA/PANO	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	<i>R</i> ²	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	<i>R</i> ²
Echimidin	0,8	92,6	3,4	0,9958	0,8	79,9	5,9	95,0	1,9	0,9993
Echimidin- <i>N</i> -Oxid	0,8	99,7	7,2	0,9974	0,8	85,7	4,5	96,6	3,9	0,9995
Erucifolin	0,8	96,8	8,6	0,9986	0,8	87,2	14,5	97,4	5,1	0,9981
Erucifolin- <i>N</i> -Oxid	0,8	101,0	6,5	0,9981	0,8	90,1	8,4	94,4	4,9	0,9981
Heliotrin	0,8	100,5	4,4	0,9975	0,8	89,3	3,6	97,4	6,3	0,9987
Heliotrin- <i>N</i> -Oxid	0,8	104,8	2,8	0,9977	0,8	92,2	3,2	95,8	3,4	0,9960
Integerrimin	0,8	89,3	7,9	0,9979	0,8	85,9	2,6	92,3	2,3	0,9992
Integerrimin- <i>N</i> -Oxid ^a	0,8	106,0	9,5	0,9978	0,8	91,6	2,6	93,5	3,0	0,9963
Jacobin	0,8	119,1	2,5	0,9948	0,8	107,1	1,8	109,9	10,6	0,9994
Jacobin- <i>N</i> -Oxid	0,8	103,0	2,4	0,9975	0,8	94,5	5,7	98,8	4,5	0,9975
Jacolin	0,8	103,6	6,3	0,9903	0,8	95,6	4,8	99,2	5,9	0,9981
Jacolin- <i>N</i> -Oxid	0,8	73,8	4,2	0,9989	0,8	88,4	11,2	94,0	5,5	0,9946
Jaconin	0,8	65,6	7,3	0,9971	0,8	65,1	9,7	73,6	5,1	0,9902
Lasiocarpin	0,8	96,4	5,9	0,9980	0,8	92,3	1,7	94,4	2,6	0,9995
Lasiocarpin- <i>N</i> -Oxid	0,8	103,1	8,4	0,9951	0,8	88,3	4,3	95,8	4,3	0,9976
Lycopsamin	0,8	101,5	3,5	0,9959	0,8	90,4	6,7	95,7	2,5	0,9962
Lycopsamin- <i>N</i> -Oxid	0,8	88,5	7,4	0,9973	0,8	94,5	5,5	92,6	6,4	0,9967
Merenskin	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,1	82,5	9,4	82,3	5,4	0,9967 ^b
Merenskin- <i>N</i> -Oxid	0,8	29,8	25,0	0,9945	n.b.	n.b.	n.b.	42,8	30,3	0,9987

n.b.: nicht bestimmbar

^a Matrixinterferenz im Qualifier-Massenübergang, zusätzliche Verwendung der Massenübergänge von Senecionin-*N*-Oxid für die eindeutige Identifizierung

^b *n* = 5

Tabelle 15: Fortsetzung

	Käse nach 56 Tagen Reifung (Weichkäse Typ Feta)				Käse nach 112 Tagen (Schnittkäse Typ Manchego)					
		Dotierung 2,5 µg/kg				Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg		
PA/PANO	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	R ²	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R ²
Merepoxin	2,1	114,1	12,3	0,9924 ^b	0,8	100,2	11,0	106,5	9,0	0,9907
Merepoxin- <i>N</i> -Oxid	2,1	160,9	5,2	0,9977 ^b	0,8	132,1	3,4	125,4	6,4	0,9966
Monocrotalin	0,8	97,5	6,3	0,9902	0,8	88,8	5,1	96,5	8,3	0,9966
Monocrotalin- <i>N</i> -Oxid	0,8	73,1	4,6	0,9974	0,8	83,0	10,0	91,6	4,3	0,9969
Retrorsin	0,8	107,8	4,9	0,9995	0,8	98,1	2,8	95,0	6,5	0,9982
Retrorsin- <i>N</i> -Oxid	0,8	104,9	10,8	0,9941	0,8	92,2	10,8	96,1	3,8	0,9945
Riddelliin	0,8	99,1	11,3	0,9990	2,1	88,8	13,8	94,4	6,9	0,9993 ^b
Riddelliin- <i>N</i> -Oxid	0,8	99,8	5,2	0,9971	0,8	89,5	8,8	93,7	4,0	0,9986
Sceleratin	0,8	103,9	13,1	0,9902	0,8	90,5	4,0	98,6	8,7	0,9952
Sceleratin- <i>N</i> -Oxid	0,8	92,3	10,6	0,9861	0,8	92,2	10,3	99,7	6,7	0,9987
Senecionin	0,8	93,6	6,4	0,9966	0,8	88,1	3,4	92,8	3,1	0,9985
Senecionin- <i>N</i> -Oxid	0,8	108,7	8,0	0,9989	0,8	103,0	7,8	105,0	3,9	0,9960
Seneciphyllin	0,8	107,9	6,1	0,9978	0,8	84,6	6,3	93,5	3,3	0,9963
Seneciphyllin- <i>N</i> -Oxid	0,8	98,1	9,5	0,9903	0,8	92,5	5,8	97,5	3,2	0,9888
Senecivernin	0,8	95,6	7,8	0,9978	0,8	82,9	10,0	93,7	7,8	0,9925
Senecivernin- <i>N</i> -Oxid	0,8	113,8	7,1	0,9983	0,8	94,9	6,6	101,8	6,9	0,9970
Senkirkin	0,8	101,8	2,3	0,9921	0,8	78,2	10,3	104,0	7,9	0,9974
Spartioidin	0,8	92,9	9,7	0,9994	0,8	82,8	7,3	89,9	3,8	0,9983
Usaramin	0,8	102,9	8,3	0,9989	0,8	94,7	5,4	97,8	5,4	0,9982
Usaramin- <i>N</i> -Oxid	0,8	98,0	4,9	0,9953	0,8	95,3	9,7	99,5	3,9	0,9960

n.b.: nicht bestimmbar

^a Matrixinterferenz im Qualifier-Massenübergang, zusätzliche Verwendung der Massenübergänge von Senecionin-*N*-Oxid für die eindeutige Identifizierung^b $n = 5$

Tabelle 16: Überblick über die Validierungsdaten der Methodik für die Bestimmung des Pyrrolizidinalkaloid (PA) /PA-N-Oxid (PANO) -Gehalts in den Proben der Käse-Sets hergestellt aus Schafs- und Ziegenmilch (Teil III). Durchschnittliche Wiederfindungsraten (WFR) und Wiederholbarkeit (ausgedrückt als relative Standardabweichung, RSD_r) bei zwei Dotierungsstufen mit $n = 5$ Wiederholungen, Bestimmungsgrenze (LOQ) und Bestimmtheitsmaß (R^2). Der Kalibrierbereich war 0,8 bis 16,7 µg/kg ($n = 6$ Punkte) bezogen auf den Gehalt im Probenmaterial.

	Käse vor dem Salzen (Weichkäse Typ Picodon)						Käse nach dem Salzen (Weichkäse Typ Picodon)						Käse nach 21 Tagen Reifung (Weichkäse Typ Picodon)					
		Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg				Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg				Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg		
PA/PANO	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R^2	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R^2	LOQ [µg/kg]	WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	R^2
Echimidin	0,8	90,2	2,9	81,4	4,9	0,9951 ^a	0,8	94,1	4,8	96,7	2,1	0,9989	0,8	94,6	7,2	98,4	6,6	0,9959
Echimidin-N-Oxid	0,8	98,1	4,0	93,0	3,3	0,9999 ^a	0,8	102,4	3,1	102,0	2,4	0,9960	0,8	90,5	3,0	90,9	2,1	0,9988
Erucifolin	0,8	91,9	2,4	88,2	2,9	0,9996 ^a	0,8	96,2	7,6	97,1	4,6	0,9995	2,1	77,6	8,7	86,6	2,5	0,9990 ^a
Erucifolin-N-Oxid	0,8	99,2	8,5	91,2	4,8	0,9986 ^a	0,8	94,3	9,1	91,6	4,4	0,9985	0,8	82,0	7,7	82,6	3,0	0,9980
Heliotrin	0,8	92,2	3,5	90,4	5,5	0,9996 ^a	0,8	94,1	5,3	93,2	2,6	0,9988	0,8	89,7	5,0	91,1	1,5	0,9972
Heliotrin-N-Oxid	0,8	101,5	2,2	94,3	2,6	0,9994 ^a	0,8	96,6	4,0	100,9	3,7	0,9988	0,8	88,8	1,3	87,7	2,3	0,9949
Integerrimin	0,8	100,0	2,8	98,1	6,5	0,9996 ^a	0,8	99,0	5,1	96,6	6,0	0,9903	0,8	100,9	6,4	92,1	4,4	0,9951
Integerrimin-N-Oxid	0,8	99,0	3,4	92,6	5,2	0,9996 ^a	0,8	99,2	6,5	98,2	3,2	0,9989	0,8	97,4	13,5	88,1	5,3	0,9949
Jacobin	0,8	124,2	5,2	114,7	5,5	0,9995 ^a	0,8	138,3	13,7	141,2	7,7	0,9937	2,1	107,8	9,0	112,5	7,2	0,9992 ^a
Jacobin-N-Oxid	0,8	92,6	3,5	88,9	3,7	0,9998 ^a	0,8	94,1	2,8	93,9	7,7	0,9999	0,8	83,1	3,3	84,2	3,2	0,9984
Jacolin	0,8	90,5	8,2	90,7	2,9	0,9988 ^a	0,8	96,5	10,5	97,2	2,7	0,9990	0,8	83,4	13,0	87,9	4,6	0,9927
Jacolin-N-Oxid	0,8	98,1	3,1	90,2	6,1	0,9997 ^a	0,8	96,3	8,0	99,1	13,2	0,9941	0,8	53,0	8,5	52,8	3,4	0,9937
Jaconin	0,8	62,3	10,6	57,2	7,6	0,9983 ^a	0,8	40,8	33,8	36,0	15,0	0,9966	0,8	41,4	28,2	49,8	5,2	0,9966
Lasiocarpin	0,8	97,9	3,2	93,9	3,6	0,9990 ^a	0,8	103,4	4,1	99,9	2,5	0,9961	0,8	88,7	4,3	91,4	2,5	0,9978
Lasiocarpin-N-Oxid	0,8	97,1	3,1	93,4	3,4	0,9985 ^a	0,8	94,6	8,0	97,3	4,2	0,9876	0,8	94,1	9,8	90,3	2,6	0,9994
Lycopsamin	0,8	92,5	5,6	86,7	1,8	0,9990 ^a	0,8	97,2	1,6	98,2	3,8	0,9986	0,8	91,6	4,2	93,9	2,8	0,9905
Lycopsamin-N-Oxid	0,8	101,7	3,2	92,8	4,0	0,9999 ^a	0,8	91,4	4,2	95,8	6,2	0,9981	0,8	67,4	3,1	63,8	6,8	0,9930
Merenskin	0,8	85,2	8,2	73,7	5,0	0,9996 ^a	0,8	70,5	18,3	72,1	7,9	0,9921 ^a	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Merenskin-N-Oxid	0,8	29,6	33,4	21,2	24,3	0,9999 ^a	0,8	6,5	141,0	5,5	67,7	0,9965	n.b.	n.b.	n.b.	11,9	20,9	0,9945

n.b.: nicht bestimmbar

^a $n = 5$, ^b $n = 4$

^c höchster verwendeter Kalibrierstandard war 12,5 µg/kg, $n = 4$

^d höchster verwendeter Kalibrierstandard war 12,5 µg/kg, $n = 5$

Tabelle 16: Fortsetzung

PA/PANO	Käse vor dem Salzen (Weichkäse Typ Picodon)						Käse nach dem Salzen (Weichkäse Typ Picodon)						Käse nach 21 Tagen Reifung (Weichkäse Typ Picodon)					
	LOQ [µg/kg]	Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg		R^2	LOQ [µg/kg]	Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg		R^2	LOQ [µg/kg]	Dotierung 2,5 µg/kg		Dotierung 10 µg/kg		R^2
		WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]			WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]			WFR [%]	RSD [%]	WFR [%]	RSD [%]	
Merepoxin	2,1	98,7	18,9	104,3	6,8	0,9926 ^b	2,1	95,9	10,8	133,8	10,8	0,9868 ^c	2,1	108,3	14,3	102,7	7,2	0,9925 ^a
Merepoxin- <i>N</i> -Oxid	0,8	161,7	5,9	157,5	4,5	0,9998 ^a	0,8	172,8	3,4	173,4	5,1	0,9959	0,8	147,1	7,0	151,1	3,7	0,9925
Monocrotalin	0,8	89,0	5,5	87,5	2,5	0,9991 ^a	0,8	98,5	3,7	96,6	3,4	0,9971	0,8	83,2	4,4	92,1	4,4	0,9968
Monocrotalin- <i>N</i> -Oxid	0,8	90,3	5,5	86,6	3,7	0,9993 ^a	0,8	92,9	9,0	94,5	13,8	0,9970	0,8	55,2	4,2	54,5	4,6	0,9949
Retrorsin	0,8	91,1	4,0	94,3	4,6	0,9983 ^a	0,8	91,5	9,2	94,7	5,9	0,9984	0,8	86,8	5,2	81,9	6,6	0,9943
Retrorsin- <i>N</i> -Oxid	0,8	96,6	5,6	92,3	4,1	0,9973 ^a	0,8	94,0	5,7	101,7	2,8	0,9991	0,8	89,4	2,3	86,8	5,3	0,9944
Riddelliin	2,1	73,7	11,8	81,5	9,0	0,9919 ^b	0,8	98,9	5,4	92,6	5,4	0,9968	2,1	86,7	7,6	74,6	3,1	0,9903 ^a
Riddelliin- <i>N</i> -Oxid	0,8	95,2	3,8	86,4	3,3	0,9990 ^a	0,8	82,3	3,7	86,7	3,6	0,9985	0,8	81,7	9,6	85,2	4,9	0,9982
Sceleratin	0,8	93,5	7,8	89,0	4,8	0,9999 ^a	0,8	92,6	5,0	94,9	5,3	0,9963	2,1	89,0	14,2	87,8	4,9	0,9877 ^a
Sceleratin- <i>N</i> -Oxid	0,8	98,6	7,8	95,5	5,4	0,9987 ^a	0,8	93,7	4,6	90,1	5,7	0,9967	0,8	72,2	5,7	67,4	5,4	0,9962
Senecionin	0,8	98,5	2,9	99,1	9,1	0,9984 ^a	0,8	95,4	4,9	95,9	2,8	0,9985	0,8	81,1	2,5	85,6	1,1	0,9969
Senecionin- <i>N</i> -Oxid	0,8	94,5	6,3	92,5	2,5	0,9990 ^a	0,8	93,3	2,6	99,8	4,3	0,9993	0,8	103,7	15,0	94,5	11,8	0,9984
Seneciphyllin	0,8	84,5	6,1	87,5	6,0	0,9987 ^a	0,8	89,7	10,0	92,0	3,0	0,9985	2,1	71,7	11,3	87,7	5,4	0,9978 ^a
Seneciphyllin- <i>N</i> -Oxid	0,8	94,8	4,1	90,1	4,2	0,9999 ^a	0,8	91,7	2,0	92,1	2,1	0,9986	0,8	83,4	9,0	88,6	2,6	0,9982 ^a
Senecivernin	2,1	88,8	12,1	117,1	20,6	0,9965 ^b	0,8	87,2	4,9	85,3	7,1	0,9951 ^d	0,8	92,6	8,7	89,0	4,2	0,9976
Senecivernin- <i>N</i> -Oxid	0,8	94,2	3,3	88,1	5,0	0,9997 ^a	0,8	94,8	5,8	98,3	0,9	0,9907	0,8	105,6	14,1	94,2	6,5	0,9917
Senkirkin	0,8	92,8	4,6	90,5	2,6	0,9992 ^a	0,8	97,1	5,1	99,7	3,3	0,9984	0,8	89,0	3,0	90,4	2,2	0,9933
Spartioidin	0,8	89,2	5,2	86,6	4,0	1,0000 ^a	0,8	79,8	7,5	91,3	5,1	0,9974 ^d	0,8	88,9	13,5	83,7	4,1	0,9998
Usaramin	0,8	96,6	4,1	93,9	5,6	0,9986 ^a	0,8	92,5	5,5	97,2	6,5	0,9986	0,8	86,3	7,8	87,9	3,4	0,9984
Usaramin- <i>N</i> -Oxid	0,8	95,6	4,7	90,1	4,3	0,9997 ^a	0,8	96,8	5,3	99,1	3,4	0,9890	0,8	94,6	5,7	89,2	3,3	0,9958

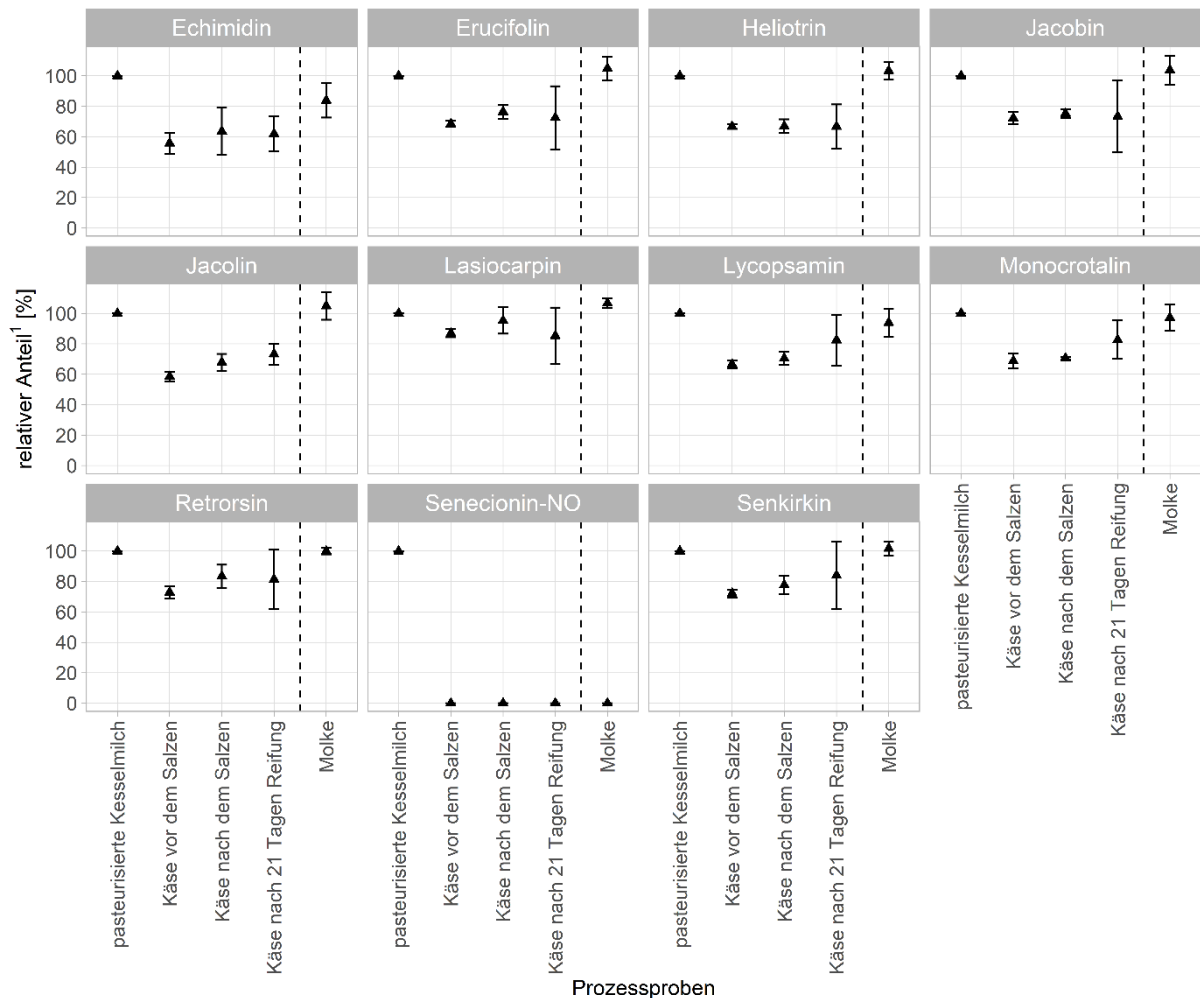
n.b.: nicht bestimmbar

^a $n = 5$, ^b $n = 4$ ^c höchster verwendeter Kalibrierstandard war 12,5 µg/kg, $n = 4$ ^d höchster verwendeter Kalibrierstandard war 12,5 µg/kg, $n = 5$

PA/PANO in Weichkäse Typ Picodon aus Ziegenmilch sowie dessen Prozessstufen

A. Künstlich kontaminierter Weichkäse Typ Picodon

Im finalen Produkt (Käse nach 21 Tagen Reifung) betrug der relative Anteil des Gehalts der zu dotierten PA noch zwischen $61,8 \pm 11,6\%$ (Echimidin) und $85,3 \pm 18,6\%$ (Lasiocarpin) bezogen auf die Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) (Abbildung 13). Das PANO Senecionin-*N*-Oxid wurde im finalen Produkt nicht über LOQ nachgewiesen.



¹ Relativer Anteil des PA/PANO-Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch)

Abbildung 13: Relativer Anteil des Pyrrolizidinalkaloid und -*N*-Oxid (PA/PANO) -Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) von PA/PANO in unterschiedlichen Prozessstufen bei der Herstellung von Weichkäse Typ Picodon aus künstlich mit PA/PANO dotierter Milch ($i = 3$ Chargen). Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der Ausgangsmilch der jeweiligen Charge bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

Die in der Molke bestimmten relativen Anteile des Gehalts waren zwischen $83,9 \pm 11,3 \%$ (Echimidin) und $106,7 \pm 3,1\%$ (Lasiocarpin) bezogen auf die Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch). Im Gegensatz dazu wurden im Käse vor dem Salzen noch ein relativer Anteil des Gehalts von $55,7 \pm 6,9 \%$ (Echimidin) bis $87,0 \pm 2,7 \%$ (Lasiocarpin) bezogen auf den Gehalt in der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) bestimmt. Nach dem Salzen war dieser Anteil zwischen $63,5 \pm 15,5 \%$ (Echimidin) und $95,3 \pm 8,6 \%$ (Lasiocarpin).

Die verbleibenden relativen Anteile des PA-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch schwankten zwischen den drei hergestellten Chargen im finalen Produkt (Käse nach 21 Tagen Reifung) mit RSD-Werten von $7,0 \%$ (Jacolin) bis $23,8 \%$ (Jacobin) am weitesten.

Insgesamt beeinflussten bei dem Weichkäse Typ Picodon aus künstlich kontaminierter Ziegenmilch das Salzen oder die Reifung, den relativen Anteil Gehalt von PAs bezogen auf die Ausgangsmilch nicht oder nur gering (Abbildung 13).

Im Gegensatz zu den PA war Senecionin-*N*-Oxid (Gehalt in der Ausgangsmilch: $53,5 \pm 2,2 \text{ nmol/kg}$) bereits in der Probe des Käses vor dem Salzen sowie in dem vorab abgeführten Nebenstrom der Molke nicht mehr über LOQ nachweisbar (Abbildungen 13 und 14). Gegengleich war der Gehalt des korrespondierenden PA Senecionin in dem Käse vor dem Salzen und der Molke auf $43,5 \pm 2,0$ bzw. $50,8 \pm 0,6 \text{ nmol/kg}$ angestiegen. Eine Reduktion von Senecionin-*N*-Oxid zu der freien Base Senecionin erfolgte somit bereits in den Prozessschritten Fermentieren oder Einlaben (Abbildung 14). Das Salzen des Käselaibs führte, wie auch bei den anderen zu dotierten PA, zu keiner Veränderung des Gehalts. Nach 21 Tagen Reifung war eine geringe Abnahme des Senecionin-Gehalts auf $36,4 \pm 8,8 \text{ nmol/kg}$ zu beobachten.

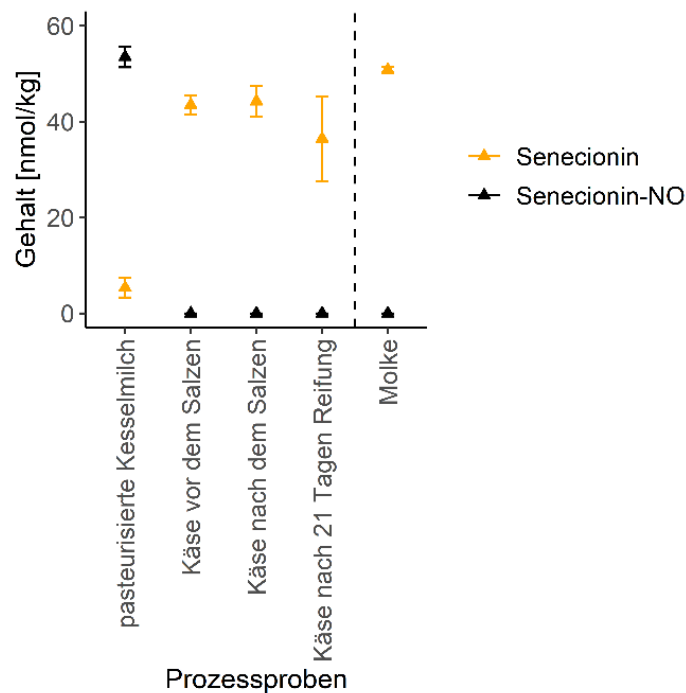


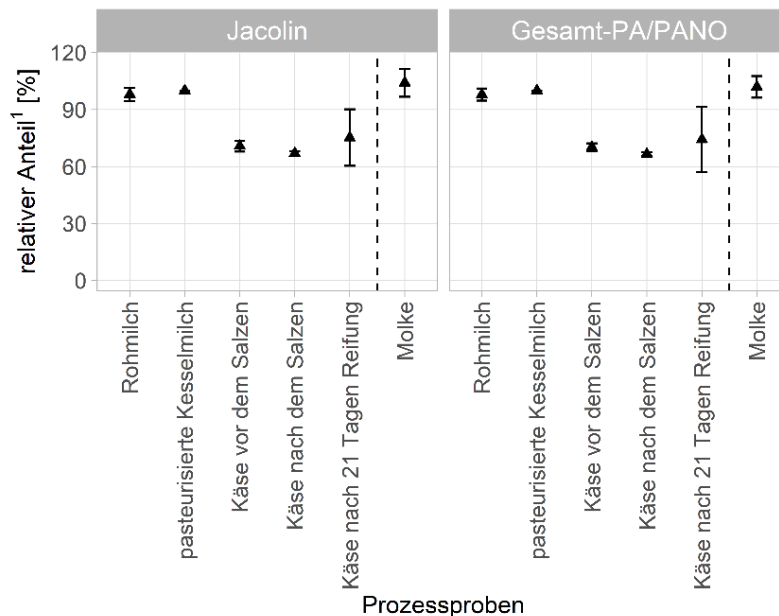
Abbildung 14: Senecionin-*N*-Oxid- und Senecionin-Gehalt [nmol/kg] in den Prozessstufen während der Herstellung des Weichkäses Typ Picodon aus künstlich kontaminierter Ziegenmilch. Mittelwert aus den einzelnen Chargen ($i = 3$) mit Standardabweichung als Fehlerbalken.

B. Natürlich kontaminierter Weichkäse Typ Picodon

Durch die natürliche Kontamination mit PA/PANO konnte der Einfluss der Pasteurisierung als ersten Schritt in der Käseherstellung untersucht werden. Der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt in der Rohmilch betrug $97,9 \pm 3,2$ % des PA/PANO-Gehalts in der pasteurisierten Kesselmilch, die für die Herstellung aller Milchprodukte als Referenz (Ausgangsmilch) diente. Die Pasteurisierung hatte somit keinen Einfluss auf den relativen Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt.

Im Endprodukt (Käse nach 21 Tagen Reifung) betrug der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt noch $74,3 \pm 17,1$ % bezogen auf die Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) (Abbildung 15). Der Gehalt des Hauptanalyten Jacolin hatte einen relativen Anteil von $75,3 \pm 14,9$ bezogen auf den Jacolin-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch). Der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt in der Molke entsprach $102,0 \pm 35,7$ % des Gehalts in der Ausgangsmilch. Im Gegensatz dazu wurden im Käse vor dem Salzen noch ein relativer Anteil von $70,3 \pm 2,0$ % festgestellt. Der relative Anteil des Jacolin-Gehalts in der Molke und im Käse vor dem Salzen war bezogen auf die Ausgangsmilch $104,1 \pm 7,4$ % bzw. $70,8 \pm 2,9$ %.

Ebenso wie bei der Herstellung von Weichkäse Typ Picodon aus künstlich kontaminierter Ziegenmilch, wies der Käse nach 21 Tagen Reifung eine im Vergleich hohe Variabilität zwischen den drei Chargen auf.



¹ Relativer Anteil des PA/PANO-Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch)

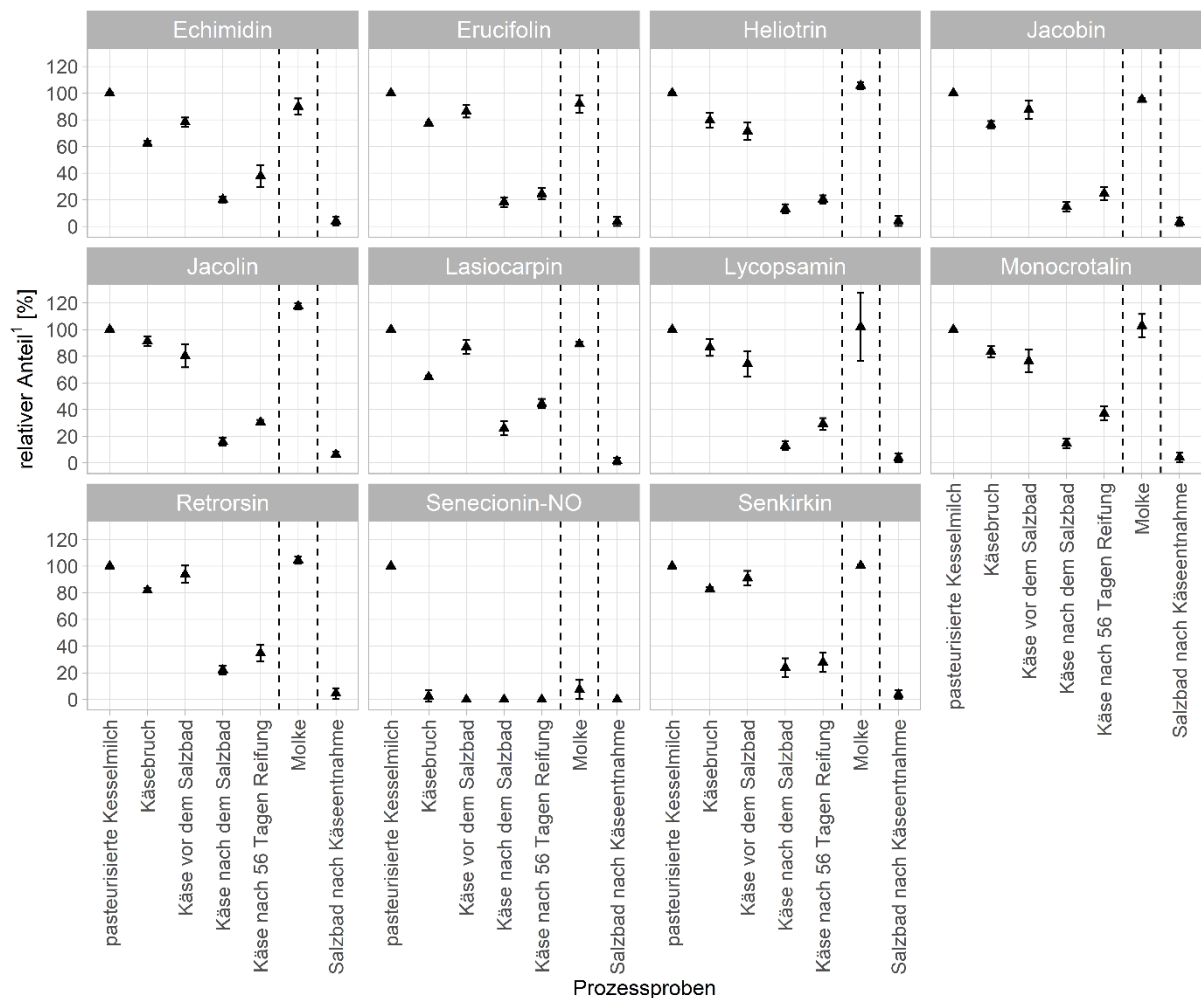
Abbildung 15: Relativer Anteil des Pyrrolizidinalkaloid und -N-Oxid (PA/PANO) -Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) von PA/PANO in unterschiedlichen Prozessstufen bei der Herstellung von Weichkäse Typ Picodon aus natürlich mit PA/PANO dotierter Milch ($i = 3$ Chargen). Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der Ausgangsmilch der jeweiligen Charge bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

Das PANO Jacolin-N-Oxid war in der natürlich kontaminierten Rohmilch und der pasteurisierten Kesselmilch in geringen Gehalten über LOQ vorhanden (Daten nicht gezeigt). In den weiteren Proben wurde Jacolin-N-Oxid nicht über LOQ nachgewiesen.

PA/PANO in Weichkäse Typ Feta aus Schafmilch sowie dessen Prozessstufen

A. Künstlich kontaminierter Weichkäse Typ Feta

Im finalen Produkt (Käse nach 56 Tagen Reifung) lag der relative Anteil des Gehalts der zu dotierten PA zwischen $20,3 \pm 3,0$ % (Heliotrin) und $44,5 \pm 3,5$ % (Lasiocarpin) bezogen auf den Gehalt in der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) (Abbildung 16). Das PANO Senecionin-N-Oxid wurde im finalen Produkt nicht über LOQ nachgewiesen.



¹ Relativer Anteil des PA/PANO-Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch)

Abbildung 16: Relativer Anteil des Pyrrolizidinalkaloid und -N-Oxid (PA/PANO) -Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) von PA/PANO in unterschiedlichen Prozessstufen bei der Herstellung von Weichkäse Typ Feta aus künstlich mit PA/PANO dotierter Milch ($i = 3$ Chargen). Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der Ausgangsmilch der jeweiligen Charge bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

In der Molke wurden relative Anteile des Gehalts der jeweiligen PA zwischen $89,1 \pm 1,5\%$ (Lasiocarpin) und $117,6 \pm 2,4 \%$ (Jacolin) bezogen auf die Ausgangsmilch nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde im Käsebruch noch ein relativer Anteil zwischen $64,5 \pm 1,2\%$ (Lasiocarpin) und $91,2 \pm 3,4 \%$ (Jacolin) bestimmt.

Die verringerten relativen Anteile der Gehalte im finalen Produkt im Vergleich zur Ausgangsmilch waren wesentlich durch die lange Verweilzeit des Käses im Salzbad bedingt. Während im Käse vor dem Salzbad der relative Anteil des jeweiligen PA-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch zwischen $71,4 \pm 6,7 \%$ (Heliotrin) und $93,8 \pm 6,5 \%$ (Retrorsin) lagen, waren diese im Käse nach dem Salzbad zwischen $13,1 \pm 3,0 \%$ (Lycopsamin) und $26,0 \pm 5,1 \%$ (Lasiocarpin). Im Salzbad nach der Käseentnahme wurden in zwei von drei Chargen alle PA über LOQ nachgewiesen; hierbei sind die geringen relativen Anteile des PA-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch durch das hohe Volumen des Salzbad von 10 kg bedingt (3.2.1.1.).

Senecionin-*N*-Oxid war in zwei von drei Chargen im Käsebruch und in der Molke über LOQ vorhanden. Gemittelt über alle Chargen entspricht dies einem relativen Anteil am PA-Gehalt von $2,5 \pm 4,3 \%$ für den Käsebruch und von $7,4 \pm 7,2 \%$ für die Molke bezogen auf die Ausgangsmilch (Abbildung 16). In den weiteren Proben war der Senecionin-*N*-Oxid-Gehalt in keiner Charge über der BG. Eine Reduktion des PANO zur freien Base Senecionin wurde ebenfalls während der Herstellung von Weichkäse Typ Feta beobachtet (Daten nicht gezeigt). Das gebildete Senecionin verhielt sich im weiteren Verlauf der Herstellung des Weichkäses Typ Feta vergleichbar zu den anderen dotierten PA.

B. Natürlich kontaminierter Weichkäse Typ Feta

Durch die Pasteurisierung wurde derer relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt nicht beeinflusst. Der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts in der Rohmilch betrug $102,0 \pm 12,8 \%$ des PA/PANO-Gesamtgehalts in der pasteurisierten Kesselmilch, die für die Herstellung aller Milchprodukte als Referenz (Ausgangsmilch) als diene.

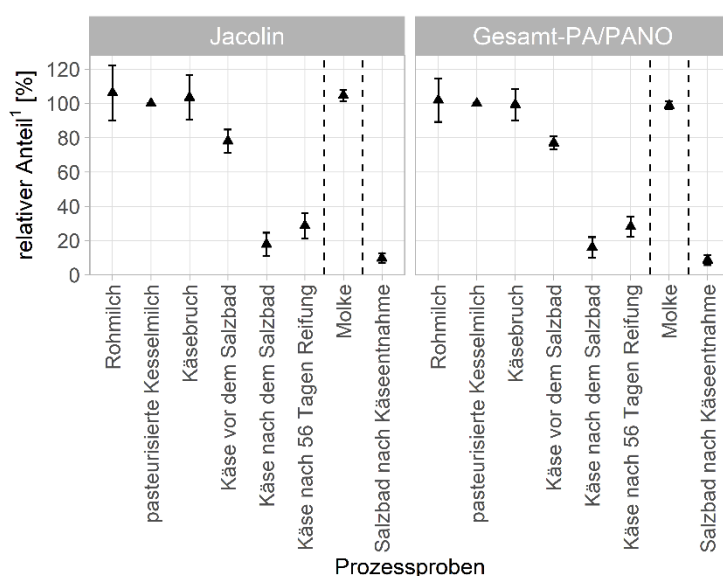
Im finalen Produkt (Käse nach 56 Tagen Reifung) lag der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt bei $28,2 \pm 5,8 \%$ bezogen auf die Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) (Abbildung 17). Der relative Anteil des Gehalts von Jacolin bezogen auf die Ausgangsmilch war $28,7 \pm 7,4 \%$.

In der Molke wurde ein relativer Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt von $98,8 \pm 2,3 \%$ bezogen auf die Ausgangsmilch bestimmt. Im Käsebruch wurde ein relativer Anteil von $99,3 \pm 9,1 \%$ festgestellt. Der relative Anteil des Jacolin-Gehalts in der Molke und im Käse vor dem Salzbad war bezogen auf den Jacolin-Gehalt der Ausgangsmilch $104,6 \pm 3,3 \%$ bzw. $103,5 \pm 13,0 \%$.

Der verringerte relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt im finalen Produkt des Weichkäses Typ Feta aus natürlich kontaminierter Schafmilch ist ebenfalls wesentlich durch das Salzbad bedingt. Während im Käse vor dem Salzbad noch ein relativer Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt von $77,0 \pm 3,7 \%$ bezogen auf die Ausgangsmilch bestimmt wurde, wurden im Käse nach dem Salzbad nur noch $16,1 \pm 5,9 \%$ bestimmt.

Der relative Anteil des Jacolin-Gehalts im Käse vor dem Salzbad und im Käse nach dem Salzbad war bezogen auf den Jacolin-Gehalt der Ausgangsmilch $78,0 \pm 6,7 \%$ und $17,9 \pm 6,7 \%$.

Während in der Rohmilchprobe nur das PANO Jacobin-*N*-Oxid über LOQ vorhanden war (Daten nicht gezeigt), wurde in der pasteurisierten Kesselmilch Jacobin-*N*-Oxid und Jacolin-*N*-Oxid über LOQ nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Herstellung waren Jacobin-*N*-Oxid und Jacolin-*N*-Oxid nur in der Käsebruchprobe von zwei bzw. einer der drei Chargen über LOQ vorhanden.



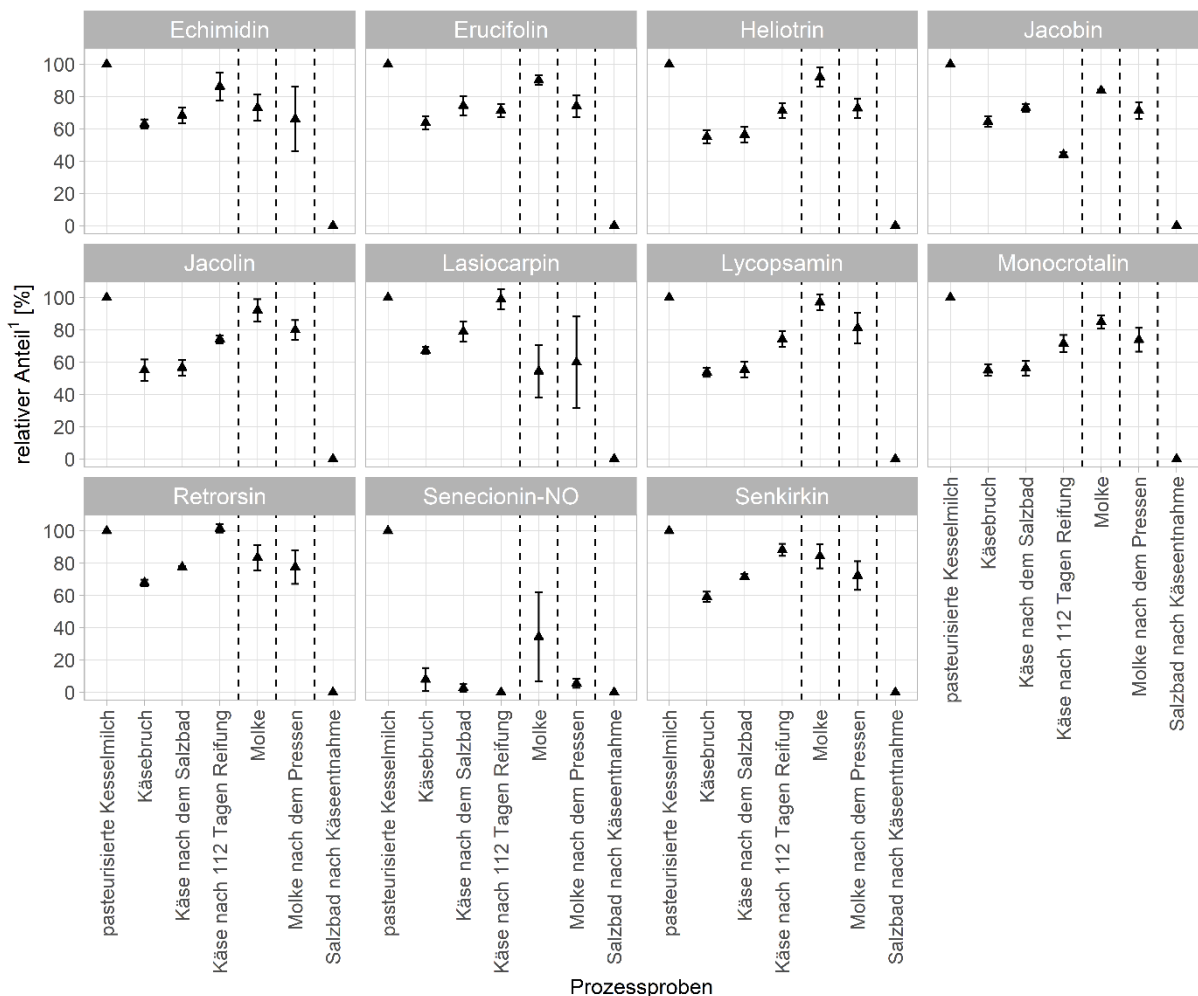
¹ Relativer Anteil des PA/PANO-Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch)

Abbildung 17: Relativer Anteil des Pyrrolizidinalkaloid und -*N*-Oxid (PA/PANO) -Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) von PA/PANO in unterschiedlichen Prozessstufen bei der Herstellung von Weichkäse Typ Feta aus natürlich mit PA/PANO dotierter Milch ($i = 3$ Chargen). Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der Ausgangsmilch der jeweiligen Charge bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

PA/PANO in Hartkäse Typ Manchego aus Schafmilch sowie dessen Prozessstufen

A. Künstlich kontaminierter Hartkäse Typ Manchego

Im fertigen Produkt (Käse nach 112 Tagen Reifung) lag der relative Anteil des Gehalts der PA zwischen $44,0 \pm 1,7 \%$ (Jacobin) und $101,5 \pm 2,5 \%$ (Retrorsin) des jeweiligen Gehalts in der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) (Abbildung 18). Das PANO Senecionin-*N*-Oxid wurde im finalen Produkt nicht über LOQ nachgewiesen.



¹ Relativer Anteil des PA/PANO-Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch)

Abbildung 18: Relativer Anteil des Pyrrolizidinalkaloid und -N-Oxid (PA/PANO) -Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) von PA/PANO in unterschiedlichen Prozessstufen bei der Herstellung von Hartkäse Typ Manchego aus künstlich mit PA/PANO dotierter Milch ($i = 3$ Chargen). Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der Ausgangsmilch der jeweiligen Charge bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

In der Molke wurde ein Anteil des PA/PANO-Gehalts zwischen $54,5 \pm 16,1$ % (Lasiocarpin) und $97,3 \pm 4,9$ % (Lycopsamin) bezogen auf die Ausgangsmilch bestimmt. Gegengleich dazu war im Käsebruch noch ein relativer Anteil zwischen $53,7 \pm 2,8\%$ (Lycopsamin) und $67,9 \pm 1,9$ % (Retrorsin) im Vergleich zur Ausgangsmilch enthalten. Der relative Anteil des Gehalts der PAs in der Molke nach dem Pressen, welche nach der Probe des Käsebruch abgenommen wurde, lag bezogen auf den Gehalt in der Ausgangsmilch zwischen $60,0 \pm 28,3$ % (Lasiocarpin) und $81,2 \pm 9,4$ % (Lycopsamin).

In der Probe des Käses nach dem Salzbad waren der Anteil des Gehalts der PA zwischen $55,3 \pm 4,9 \%$ (Lycopsamin) und $79,0 \pm 6,1 \%$ (Lasiocarpin) relativ zum Gehalt in der Ausgangsmilch. Diese relativen Anteile waren nur geringfügig gegenüber ihren jeweiligen relativen Anteilen im Käsebruch reduziert, welcher die letzte Probe vor dem Schritt des Salzbad darstellt. Im Salzbad nach der Käseentnahme wurden keine PA über LOQ nachgewiesen.

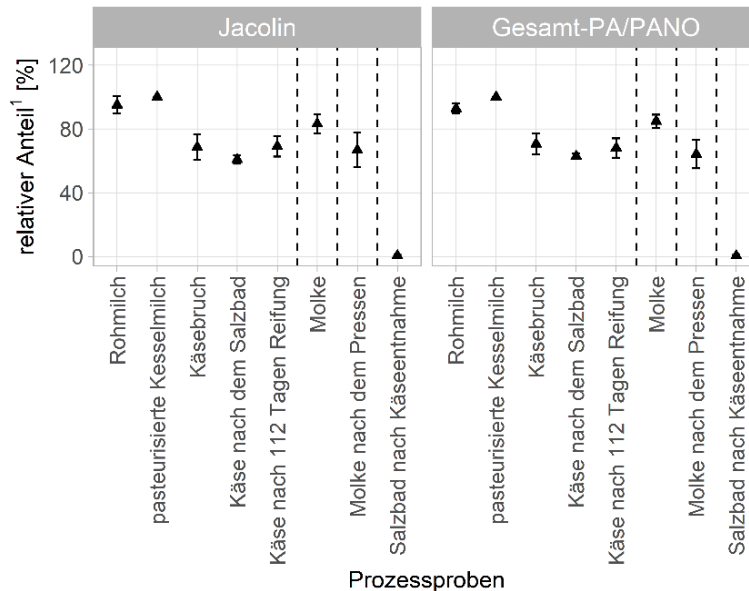
Während der 112-tägigen Reifung war für acht der zehn PA ein Anstieg im relativen Anteil des Gehalts bezogen auf den Gehalt in der Ausgangsmilch zu beobachten. Wird dagegen die deutliche Änderung der Trockenmasse des Hartkäses Typ Manchego während der Reifung (Tabelle 9) kompensiert, betrug für diese acht PA der relative Anteil im Käse nach 112 Tagen Reifung $81,8 \pm 0,1 \%$ (Senkirkin) bis $89,3 \pm 7,5 \%$ (Lycopsamin) des PA-Gehalts im Käse nach dem Salzbad, jeweils bezogen auf die Trockenmasse in den einzelnen Reifestufen. Für Jacobin und Erucifolin wurde eine höhere Abnahme auf $39,9 \pm 1,3 \%$ bzw. $63,8 \pm 3,2 \%$ des PA-Gehalts im Käse nach dem Salzbad festgestellt.

Senecionin-*N*-Oxid war in allen drei Chargen in der Molke und in der Molke nach dem Pressen, sowie in jeweils zwei von drei Chargen im Käsebruch und im Käse nach dem Salzbad, über LOQ vorhanden. Gemittelt über alle Chargen entsprach dies relativen Anteilen des Gehalts von $34,4 \pm 27,4 \%$ für die Molke, $5,5 \pm 2,7 \%$ für die Molke nach dem Pressen, $8,0 \pm 7,2 \%$ für den Käsebruch und $2,8 \pm 2,5 \%$ für den Käse nach dem Salzbad bezogen auf die Ausgangsmilch (Abbildung 18). In den weiteren Proben lag der Senecionin-*N*-Oxid-Gehalt in keiner Charge über LOQ. Eine Reduktion des *N*-Oxides zur freien Base Senecionin war ebenfalls während der Herstellung von Hartkäse Typ Manchego zu beobachten. Die hohe SD (27,4%) des relativen Anteils des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts in der Molke im Vergleich zur Ausgangsmilch zwischen den drei hergestellten Chargen spiegelte sich in den detektierten Senecionin-Gehalten wider (Daten nicht gezeigt). Dies weist daraufhin, dass die Reduktion des PANO zur freien Base in den drei Chargen unterschiedlich schnell abgelaufen ist, jedoch war in allen Chargen im Käse nach 112 Tagen Reifung das Senecionin-*N*-Oxid nicht mehr über LOQ vorhanden.

B. Natürlich kontaminierter Hartkäse Typ Manchego

Aufgrund der natürlichen Kontamination konnte ebenfalls die Pasteurisierung untersucht werden. Der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt in der Rohmilch war bezogen auf die pasteurisierten Kesselmilch, die für alle Milchprodukte als Referenz (Ausgangsmilch) verwendet wurde, bei $92,0 \pm 3,0 \%$. Eine geringe Erhöhung des Gehalts durch die Pasteurisierung beobachtet.

Im fertigen Produkt (Käse nach 112 Tagen Reifung) war der PA/PANO-Gesamtgehalt bei einem relativen Anteil von $68,0 \pm 6,1$ % bezogen auf den PA/PANO-Gesamtgehalt in der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) (Abbildung 19). Für Jacolin war dieser relative Anteil $69,1 \pm 6,4$ %.



¹ Relativer Anteil des PA/PANO-Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch)

Abbildung 19: Relativer Anteil des Pyrrolizidinalkaloid und -N-Oxid (PA/PANO) -Gehalts bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) von PA/PANO in unterschiedlichen Prozessstufen bei der Herstellung von Hartkäse Typ Manchego aus natürlich mit PA/PANO dotierter Milch ($i = 3$ Chargen). Die PA/PANO-Gehalte der Proben wurden jeweils auf den bestimmten Gehalt der Ausgangsmilch der jeweiligen Charge bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

In der Molke lag der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts bezogen auf den PA/PANO-Gesamtgehalt der Ausgangsmilch bei $84,9 \pm 4,1$ %. Für Jacolin allein war dieser bei $83,1 \pm 5,9$ %. Im Käsebruch wurde ein relativer Anteil zwischen $70,5 \pm 6,5$ % (PA/PANO-Gesamt) und $68,5 \pm 8,0$ % (Jacolin) im Vergleich zur Ausgangsmilch bestimmt. Der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt in der Molke nach dem Pressen lag bezogen auf die Ausgangsmilch bei $64,2 \pm 9,0$ %. Für Jacolin allein war dieser bei $66,7 \pm 10,9$ %.

In der Probe Käse nach dem Salzbad war ein relativer Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalt von $62,9 \pm 1,8$ % bezogen auf die Ausgangsmilch enthalten. Für Jacolin war dieser relative Anteil bei $60,8 \pm 2,7$ %. Im Vergleich mit den jeweiligen relativen Anteilen im Käsebruch, welcher die letzte Probe vor dem Schritt des Salzbad war, waren diese im Käse nach dem Salzbad geringfügig niedriger. Jacolin wurde bei einer der drei Chargen im Salzbad nach der Käseentnahme geringfügig über LOQ detektiert.

Wird die deutliche Änderung der Trockenmasse des Hartkäses Typ Manchego während der 112-tägigen Reifung (Tabelle 9) wieder kompensiert, betrug im Käse nach 112 Tagen Reifung der relative Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts bzw. des Jacolin-Gehalts allein noch bei $74,6 \pm 8,0 \%$ bzw. $78,3 \pm 6,8 \%$ des Gehalts bezogen auf die Trockenmasse im Käse nach dem Salzbad. Für Jacobin wurde auch in den Proben der natürlichen Kontamination eine höhere Abnahme des relativen Anteils des Gehalts auf $50,2 \pm 18,9 \%$ bezogen auf den korrespondierenden Jacobin-Gehalt in der Trockenmasse des Käses nach dem Salzbad festgestellt.

In der Rohmilchprobe war der Gehalt des PANO Jacobin-*N*-Oxid über LOQ (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde in der pasteurisierten Kesselmilch Jacobin-*N*-Oxid und Jacolin-*N*-Oxid über LOQ nachgewiesen. Jacobin-*N*-Oxid und Jacolin-*N*-Oxid waren auch in zwei bzw. einer der drei Chargen der Probe Molke über LOQ vorhanden. Im weiteren Verlauf der Herstellung wurde Jacobin-*N*-Oxid zusätzlich noch in den Proben Käsebruch über LOQ bestimmt.

5. Diskussion

5.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse

Die Ergebnisse dieser Studien wurden von Klein et al. 2024 publiziert (Klein et al. 2024).

Probennahme

Es ist bekannt, dass *J. vulgaris* Gaertn. bzw. *J. aquatica* (Hill) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb. in Schleswig-Holstein und Bayern sehr verbreitet sind. (Gottschalk et al. 2020; Gottschalk et al. 2018; Jung et al. 2020; Suttner et al. 2016). Deshalb wurden sie als Modellregionen für die Probennahme ausgewählt. In Bayern gedeiht *J. aquatica* (Hill) G. Gaertn., vor allem in der südlichen Region Allgäu (Regierungsbezirk Schwaben) in erheblichem Maße (Suttner et al. 2016; Gehring et al. 2021). Deshalb könnte ein höheres Bewusstsein für dieses Problem zum erhöhten Anteil an aktiven Teilnahmen in Bayern beigetragen haben. Die aktiven Teilnahmen, insbesondere in Bayern und in Teilen in Schleswig-Holstein, führen dazu, dass die gesammelten Milchproben die Gesamtsituation der PA/PANO-Kontamination in Milch direkt von Milchviehbetrieben nicht repräsentativ abdecken können. Es ist möglich, dass Milchviehbetriebe mit einem geringeren Bewusstsein für PA/PANO-haltige Pflanzen auf ihren landwirtschaftlichen Nutzflächen nicht aktiv teilgenommen haben. Ein Hinweis darauf ist beispielsweise, dass die beiden am stärksten kontaminierten Milchproben aus Probenahmen durch passive Teilnahme (Milchtankstellen) stammen.

PA/PANO-Vorkommen in Milch

In Molkereien wird bei der Verarbeitung Milch von vielen verschiedenen Einzelbetrieben gemischt bevor sie in den Einzelhandel gelangt. Das hat zur Folge, dass einzelne mit PA/PANO kontaminierte Erzeugermilch einer Verdünnung durch nicht mit PA/PANO-kontaminierte Milch unterliegen, da die PA/PANO-Menge auf das Volumen der gesamten Milch verteilt wird. So ergibt sich möglicherweise insgesamt ein höherer Anteil an PA/PANO-kontaminierten Milchproben aus dem Einzelhandel, jedoch mit deutlich geringerer PA/PANO-Konzentration im Vergleich zur ursprünglich mit PA/PANO kontaminierten Milch vom Einzelbetrieb (Mulder et al. 2018). Für PA/PANO-Kontaminationen in Honig wurde bereits gezeigt, dass einzelne Honigproben aus wenigen Herkunftsorten hoch kontaminiert sein können, während die Mehrheit gering bzw. nicht belastet ist (Gottschalk et al. 2020). Das Gleiche wird auch für die PA/PANO-Kontamination von Milch aus Einzelbetrieben vermutet: Insgesamt gibt es eine geringe PA/PANO-Kontaminationsrate, jedoch vereinzelt höhere Gehalte.

Die durchgeführte Statuserhebung bestätigt diese Hypothese. Insgesamt wurden in 11 % der Milchproben PA/PANO nachgewiesen. Im Allgemeinen waren geringe Konzentrationen enthalten (PA/PANO-positiven Proben: Mittelwert: 0,30 µg/L, Median: 0,024 µg/L; alle Milchproben: Mittelwert: 0,034 µg/L). Es wurde jedoch auch ein hoher PA/PANO-Gesamtgehalt mit 5,6 µg/L in einer Milchprobe quantifiziert. Dieser Gehalt ist etwa dreißigmal höher als PA/PANO-Gesamtgehalte, die in bisherigen Studien in Milchproben aus dem Einzelhandel bestimmt wurden (Huybrechts & Callebaut 2015; Mulder et al. 2018; Klein et al. 2022). Der bisher höchste PA/PANO-Gehalt, der in Milch bestimmt wurde, lag bei 0,17 µg/L. Dieser stammte aus einer Studie von Mulder et al. 2018, bei der 169 zufällig entnommene Kuhmilchproben aus sechs europäischen Ländern auf PA/PANO untersucht wurden (Mulder et al. 2018).

Die Ergebnisse für Schleswig-Holstein zeigten eine Kontaminationsrate von 6,7 % mit wenigen sehr hohen PA/PANO-Gesamtgehalten in der Milch. In Bayern wurde eine höhere Kontaminationsrate von 17 % festgestellt. Hierbei ist zu beachten, dass dieselben Betriebe über 3 bzw. 4 Saisons beprobt wurden und 12 von 18 PA/PANO-kontaminierten Milchproben aus nur vier Betrieben stammten, die jedoch insgesamt niedrige PA/PANO-Konzentrationen aufwiesen. Die Kontaminationsraten (6,7 % Schleswig-Holstein, 17 % Bayern) waren mit den Kontaminationsraten von 6 % und 13 %, die in Studien mit Milch aus dem Einzelhandel berichtet wurden (Huybrechts und Callebaut 2015; Mulder et al. 2018), vergleichbar. Insbesondere die Kontaminationsrate von 17 % für Milchproben aus Bayern stimmt mit den Ergebnissen einer kleinen Studie überein, in der drei von 15 Milchproben aus Verkaufsstellen oder Direktvermarktung aus Bayern PA-positiv waren (Klein et al. 2022).

Milchviehbetriebe mit ökologischer Produktion stehen im Vergleich zu konventionellen Betrieben vor größeren Herausforderungen bei der Bekämpfung von Unkräutern. Ein Beispiel dafür ist die Einschränkung beim Einsatz von Herbiziden, die für die ökologische Produktion gelten, um die Biodiversität zu schützen. Auch die Ausbringung von Mineraldüngern ist begrenzt. Die Bedingungen des ökologischen Landbaus führen somit zu einer höheren Wahrscheinlichkeit einer PA/PANO-Kontamination der Milch. Mulder et al. (2018) beobachteten, dass PA häufiger in Milch aus ökologischer Erzeugung gefunden wurden (Mulder et al. 2018). Die Daten innerhalb des Projekts zeigen diese Tendenz ebenfalls. Im Kontrast dazu zeigte sich in der durchgeführten Statuserhebung jedoch auch, dass die Häufigkeit der PA/PANO-Kontamination nicht unbedingt mit der Höhe der PA/PANO-Gehalte in der Milch verbunden ist, denn die Milchprobe mit dem höchsten PA/PANO-Summengehalt stammte aus konventioneller Produktion. Ein angepasstes Grünlandmanagement, unabhängig von einer ökologischen oder konventionellen Bewirtschaftung, ist folglich ausschlaggebend für das Risiko einer Kontamination der Milch.

Unkräuter treten als punktuelle Verunreinigungen im Futter auf oder werden tierindividuell auf der Weide aufgenommen. Daher können die Milchkühe der einzelnen Betriebe in verschiedenem Ausmaß PA/PANO-haltigem Pflanzenmaterial ausgesetzt sein. Bereits durch das Mischen der Milch der einzelnen Kühe findet somit eine gewisse Verdünnung der PA/PANO-Kontamination im einzelnen Betrieb statt. Die Beprobung der Milchbetriebe erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, weshalb es entsprechend möglich war, dass sich jeweils bei Beprobung eine unterschiedliche Anzahl von Gemelken in den Milchsammeltanks befanden. Folglich entsprechen die Milchproben nicht in jedem Fall der Milch, die tatsächlich an die Molkerei oder direkt den Verbraucher verkauft wurde. Dies ist bezüglich der bestimmten PA/PANO-Gehalte zu berücksichtigen. Eine hohe Kontamination in der Milch aus Sammel tanks oder Verkaufsstationen, die mehrere Gemelke enthält, weist darauf hin, dass PA/PANO-haltige Unkräuter im Futter bzw. auf den Flächen des Betriebs weit verbreitet sind.

Aus den vorliegenden PA/PANO-Mustern in den kontaminierten Milchproben lassen sich Rückschlüsse auf den pflanzlichen Ursprung ziehen. Dies ist jedoch nur bis zu einem gewissen Maß möglich, da sich die PA/PANO-Muster aufgrund individueller Transferraten der PA/PANO zwischen supplementiertem Pflanzenmaterial und der Milch unterscheiden (Mulder et al. 2020). PA/PANO-Transferraten vom Pflanzenmaterial in die Milch sind nur für wenige Pflanzenarten, hauptsächlich *Jacobaea* spp. verfügbar (Dickinson et al. 1976; Hoogenboom, et al. 2011; Mulder et al. 2020; Knoop et al. 2024).

Tänzer et al. (2022) zeigten, dass PANO im Pansen einer Reduktion unterliegen und so in ihre entsprechenden PA umgewandelt werden. Anschließend werden sie zu hydrierten Strukturen weiter verstoffwechselt. Die Metabolisierung zu den hydrierten Stoffwechselprodukten war bei einigen PA, insbesondere bei Jacolin, langsamer. Dies ist eine Erklärung für die höheren Transferraten einiger PA und somit auch für die Unterschiede des PA/PANO-Musters zwischen Futter und Milch (Tänzer et al. 2022).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass in Milch mit hohem PA/PANO-Summengehalt jeweils ein PA das PA/PANO-Muster dominierte, das zusammen mit anderen PA/PANO in geringeren Mengen vorkam. Das gemeinsame Auftreten von Jacolin, Jacobin und Jacolin entspricht den PA/PANO-Mustern, die in Milch nach der Exposition von Milchkühen gegenüber Kreuzkräutern festgestellt wurden (Mulder et al. 2020; Knoop et al. 2024). Dieses PA/PANO-Muster ähnelt auch dem PA/PANO-Muster in den Milchproben bei den Transferstudien in Arbeitspaket I (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I), Knoop et al. 2024), und zwar nicht nur bei den Kühen, sondern bei allen drei untersuchten Tierarten (Kuh, Schaf, Ziege). In den Transferstudien wurde ein Extrakt aus Jakobskreuzkraut (*J. vulgaris* Gaertn.) eingesetzt.

Entsprechen ist bei diesen Milchproben aus der Statuserhebung das Jakobskreuzkraut (Asteraceae) als ursächliches Pflanzenmaterial sehr wahrscheinlich. Im Falle einer geringen Kontamination würden die PA/PANO-spezifischen Transferraten bedeuten, dass nur Jacolin nachweisbar ist. Für die vier Milchproben der Statuserhebung, die Jacolin enthielten, ist somit ebenfalls *J. vulgaris* Gaertn. als wahrscheinlicher Ursprung zu identifizieren. Jacolin wurde auch von Mulder et al. (2015) in Milch aus dem Einzelhandel nachgewiesen (Mulder et al. 2015). Hinzu kommt außerdem, dass die weite Verbreitung von *J. vulgaris* Gaertn. in Norddeutschland sehr bekannt ist (Neumann & Huckauf 2016; Gottschalk et al. 2020; Jung et al. 2020).

In Probe 1 aus Bayern sind vier PA vom Ht-Typ enthalten. Diese können ihren Ursprung in Pflanzen aus der Familie der Boraginaceae haben, wie die Gewöhnliche Hundszunge (*Cynoglossum officinale*; u.a. Rinderin und Heliosupin) oder die Europäische Sonnenwende (*Heliotropium europaeum*; u. a. Heliotrin, Heliosupin, Europin und Rinderin) (Mädge et al. 2020). Individuelle Transferraten dieser PA vom Futter in die Milch sind nicht verfügbar.

Senkirkin und Lycopsamin wurden im Vergleich zu anderen PA/PANO häufiger in den bayerischen Milchproben nachgewiesen. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass bestimmte und wahrscheinlich auch die gleichen Pflanzenarten die wiederholte Kontamination verursachten. Darüber hinaus deutet der mehrfache Nachweis einer PA/PANO-Kontamination der Milch von vier Milchviehbetrieben aus Bayern auf einen dauerhaften Befall der Flächen zur Futtererzeugung mit den PA/PANO-haltigen Pflanzenarten hin. Die PA/PANO-Muster waren über die Jahreszeiten hinweg sehr ähnlich, wenn auch nicht vollständig identisch. Senkirkin wird von Pflanzen der Familie der Asteraceae synthetisiert, z. B. von Wasserkreuzkraut (*J. aquatica* (Hill) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.) und Gewöhnlicher Pestwurz (*Petasites hybridus* (L.) G. Gaertn., B. Mey. und Scherb.), die beide in Süddeutschland wachsen (Schenk et al. 2015; Gottschalk et al. 2018; FloraWeb).

Lycopsamin wird hauptsächlich von Pflanzen aus der Familie der Boraginaceae produziert (Teuscher & Lindequist 2010). In Süddeutschland kommen als Pflanzen, die diese Verbindung produzieren, z. B. *Symphytum* spp. (z. B. Gewöhnlicher Beinwell, *Symphytum officinale* agg.) und Gewöhnlicher Wasserdost (*Eupatorium cannabinum* L.) (Brown et al. 2016; Kast et al. 2018; Mädge et al. 2020; FloraWeb) in Betracht. Lycopsamin und Senkirkin wurden auch in anderen Studien in denen Milch aus dem Einzelhandel untersucht wurde häufiger nachgewiesen (Huybrechts & Callebaut 2015; Mulder et al. 2015). Das gemeinsame Auftreten von Senkirkin und Lycopsamin in zwei Milchproben deutet darauf hin, dass mindestens zwei verschiedene PA/PANO-haltige Pflanzen im Futter bzw. auf der Weide der Milchkühe vorhanden waren.

PANO wurden nur in der am höchsten belasteten Milchprobe und in geringen Konzentrationen bestimmt. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Studien von Mulder et al. (2020) und Tänzer et al. (2022) überein. Während des Pansenstoffwechsels werden PANO schnell zu ihrem korrespondierenden PA reduziert und im Folgenden zu 1,2-gesättigten Metaboliten verstoffwechselt (Mulder et al. 2020; Tänzer et al. 2022).

Saisonale Unterschiede konnten aufgrund der geringen Anzahl von PA/PANO-positiven Milchproben nicht abschließend ausgewertet werden, da der Weidegang nicht zwingend ganztätig war und unterschiedliche Futtermengen im Stall zugefüttert wurden. Zudem fehlen für die Proben, die an Milchausgabeautomaten entnommen wurden, Angaben zur Fütterung. Es blieb unklar, ob die PA/PANO-Gehalte in der Milch der Sommersaisons (B, D) durch Futtermittel oder Weidegang verursacht wurden. Bemerkenswerterweise wurde die höchste PA/PANO-Kontamination in der Wintersaison C beobachtet, was bedeutet, dass nur konservierte Futtermittel die Kontamination verursachten. Im Allgemeinen wird angenommen, dass Kühe PA/PANO-haltige Pflanzen aufgrund ihres bitteren Geschmacks auf der Weide vermeiden (Hoogenboom et al. 2011; Kalač & Kaltner 2021). Wird Grünland, auf dem PA/PANO-haltige Pflanzen wachsen, zur Herstellung von konserviertem Futter verwendet, ist es für die Milchkühe nicht möglich diese Pflanzen auszusortieren. Dies unterstreicht die Bedeutung einer guten Grünlandbewirtschaftung.

5.2. Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten

Die hergestellten Milchprodukte wurden ausgewählt, da sie für die jeweilige Milchart typische Produkte darstellten und um möglichst verschiedene Herstellungsprozesse abzubilden. Durch diese Spannweite konnten unterschiedliche Einflüsse auf die PA/PANO-Gehalte im Endprodukt untersucht werden. Zudem konnten die Ergebnisse durch die Verwendung von künstlich und natürlich kontaminierter Milch sowie durch die Herstellung mehrerer Chargen abgesichert werden. Durch die künstliche Kontamination konnte ein breites Spektrum von PA unterschiedlichen botanischen Ursprungs untersucht werden. Vor diesem Projekt waren für den Verbleib von PA/PANO bei der Herstellung von Milchprodukten lediglich Daten verfügbar, welche auf einer einmalig durchgeführten Herstellung von Joghurt und Schnittkäse des Typs Gouda aus natürlich kontaminierter Milch basierten (de Nijs et al. 2017).

5.2.1. Bestimmung der Milchinhaltsstoffe und Produktparameter (MRI)

Alle hergestellten Produkte entsprachen bezüglich dem Reifungsverlauf, Aussehen und Geruch den Erwartungen an gleichartige Handelsprodukte. Die Reproduzierbarkeit der Inhaltsstoffe lag, gemessen am Variationskoeffizient CV, als Verhältnis der Standardabweichung zum Mittelwert, im Bereich 5 - 10 % (Tabelle 9). Hauptsächlich der Weichkäse Typ Picodon wies bei der Trockenmasse einen hohen CV von 10,9 % und beim Fettgehalt von 10,3 % auf. Die Anforderungen an die Probenwiederholbarkeit der Methoden wurden mit $<0,05$ g Trockenmasse/100 g bzw. $<0,5$ g Fett/100 g immer eingehalten (VDLUFA, 2010). Die chargenweise Abweichung des Picodon war aufgrund des offenen Abtropfens der Molke in Säcken und der kleinen Laibe (80 g) größer als die Variabilität der trockenen Käse Typ Edamer oder bei im Becher abgefülltem Joghurt. Das Abtropfen der Molke konnte nur eingeschränkt reproduziert werden und wirkte sich auf alle massenbezogenen Methoden aus. Die Variationskoeffizienten des Joghurts aus der gleichen Ziegenmilch betrugen nur 1,5 % der Trockenmasse und 4,7 % des Fettgehalts.

5.2.2. Auswahl der PA/PANO für die künstliche Kontamination

Bei der Auswahl der PA/PANO für die künstliche Kontamination der Milchprodukte war das Ziel das gesamte Spektrum im Hinblick auf die strukturelle Diversität und die botanische Herkunft der PA/PANO repräsentativ darzustellen. So wurden PA/PANO, welche von den Pflanzen der Familien Asteraceae (Gattungen *Senecio/Jacobaea*), Boraginaceae und Fabaceae gebildet werden, einbezogen (Tabelle 5). Diese PA/PANO bilden die strukturelle Diversität der PA/PANO in Bezug auf den Grad der Veresterung (Monoester, offener Diester, makrozyklischer Diester) und die unterschiedlichen 1,2-ungesättigten Necinbasen (Retronecin, Heliotridin, Otonecin) ab. Durch den Einsatz von Senecionin-*N*-Oxid wurde auch die Gruppe der PANO in den Versuchen berücksichtigt. Des Weiteren wurden mit Jacolin und Jacobin die beiden PA/PANO, welche im Rahmen der Transferstudien nach Gabe des PA/PANO-Extrakts in vergleichsweise hohem Maß in Milch übergingen, ebenfalls inkludiert und damit ein direkter Vergleich ermöglicht.

5.2.3. PA/PANO-Analytik

5.2.3.1. Analysemethoden zur PA/PANO-Analytik in Milchprodukten

Validierung der Methodik für die Probensets Joghurt und Schnittkäse Typ Edamer aus Kuhmilch

Die Analysenmethode, welche für die Bestimmung von PA/PANO in Rohmilch erfolgreich validiert und angewendet wurde (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I; 4.1.), wurde ebenfalls für die Bestimmung von PA/PANO in den Probenmatrices der Probensets Schnittkäse Typ Edamer und Joghurt aus Kuhmilch validiert und verwendet.

Die bestimmten WFR und RSD-Werte für die Analytik von PA/PANO in Joghurt zeigten eine Anwendbarkeit der Methode zur quantitativen Bestimmung von PA/PANO in den Proben des Probensets Joghurt aus Kuhmilch. Insbesondere stimmten die WFR in Joghurt gut mit den WFR überein, welche im Rahmen der Validierung der Methode für die Matrix Rohmilch ermittelt wurden (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I). Gegenüber der WFR von PA/PANO in Joghurt war die WFR in dem Probenmaterial Milchgel geringfügig niedriger. Eine Vergleichbarkeit der PA/PANO-Gehalte in den beiden Matrices Joghurt und Milchgel sowie in der Ausgangsmilch war dennoch gegeben.

Die Komplexität und Vielfalt der Probenmatrices innerhalb des Probensets Schnittkäse Typ Edamer in Kombination mit der strukturellen Vielfalt der PA/PANO, führte zu einer großen Spanne an Messeinflüssen, die sich teilweise deutlich auf die Qualität des Messergebnisses auswirkten. Aus diesem Grund wurde die PA/PANO-Analytik hier insgesamt als semiquantitativ eingestuft. Im Besonderen für Jaconin, eines der relevanten PA für die Proben aus natürlich kontaminierter Milch, wurden hohe RSD-Werte in Matrices ab dem Salzbad ermittelt. Es ist wichtig, dies bei der Bewertung der Daten des Probensets Schnittkäse Typ Edamer zu berücksichtigen. Merenskin-*N*-Oxid (Isomer von Jaconin-*N*-Oxid), welches bereits bei der Methodenentwicklung und Validierung der Analytik für die Matrix Rohmilch als lediglich semiquantitativ bewertet werden konnte, ist für die Mehrheit der Matrices des Schnittkäses Typ Edamer und des Joghurt Sets als lediglich qualitativ erfassbar einzustufen bzw. war nicht bestimmbar. Frühere sensitive analytische Methoden für die Quantifizierung von PA/PANO in Milchprodukten basierten auf dem Prinzip der Standardaddition (de Nijs et al. 2017; Mulder et al. 2018; Chung & Lam 2017). Im Rahmen der zugehörigen Veröffentlichungen wurden keine Daten zur Linearität der Messung in der komplexen Matrix Käse angegeben, daher ist ein Vergleich der hier genutzten Methodik mit früheren sensitiven analytischen Ansätzen nicht möglich (de Nijs et al. 2017; Mulder et al. 2018; Mulder et al. 2015; Chung & Lam 2017).

Insgesamt ermöglichte die eingesetzte Methodik für das Probenet des Schnittkäses Typ Edamer eine semiquantitative Bestimmung der PA/PANO-Gehalte in dem komplexen Probenmaterial. Starke Veränderungen und deutliche Trends des PA/PANO-Gehalts im Laufe der Herstellung konnten so dennoch übergeordnet beschrieben werden.

Methodenoptimierung und Validierung der Methodik für das Probenet Joghurt aus Ziegenmilch

Aufgrund der Verwendung von Ziegenmilch zur Herstellung von Joghurt und Milchgel, sowie den vorgenommenen Änderungen an der Methode im Vergleich zum Probenet aus Kuhmilch, wurde die Methode umfassend für die Matrices Joghurt und Milchgel aus Ziegenmilch validiert (4.2.3.2.). Die bestimmten WFR und RSD-Werte bestätigten auch eine Anwendbarkeit der Methode zur quantitativen Bestimmung von PA/PANO in den Proben des Probenet Joghurt aus Ziegenmilch. Die WFR in Joghurt waren mit den WFR vergleichbar, welche im Rahmen der Validierung der Methode für die Matrix Rohmilch ermittelt wurden (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I). Die WFR von PA/PANO in Joghurt und im Milchgel stimmten gut überein. Eine Vergleichbarkeit der PA/PANO-Gehalte in den beiden Matrices Joghurt und Milchgel sowie in der Ausgangsmilch war gegeben.

Methodenentwicklung und -validierung für die PA/PANO-Analytik in Käseprodukten aus der Milch von kleinen Wiederkäuern sowie deren Herstellungsstufen

Wie bereits in 5.2.3.1. beschrieben, ist die PA/PANO- Analytik durch eine hohe Zahl an strukturell unterschiedlichen PA/PANO sowie einer hohen Komplexität und Diversität des Probenmaterials sehr anspruchsvoll. Insbesondere die finalen Käseprodukte unterschieden sich stark in ihrer Zusammensetzung und Konsistenz beispielsweise im Fett- und Proteingehalt, wodurch eine Abreinigung von Matrixbestandteilen durch mehrere unterschiedliche Reinigungsschritte notwendig wurde.

Bisherigen Analysemethoden (de Nijs et al. 2017; Mulder et al. 2018; Chung & Lam 2017) und auch die zunächst für dieses Projekt entwickelte analytische Methode (Klein et al. 2022) führten entweder zu einer mangelnden Sensitivität oder waren nicht auf die Vielfalt der Probenmatrices anwendbar, z. B. aufgrund von zu hoher Verdünnung, zu hoher verbleibender Matrixlast oder Verstopfen der Kartuschen.

Deshalb wurde eine Methodenoptimierung durchgeführt. In der finalen Methode war eine Kombination aus einer Fällung von Matrixbestandteilen mittels NH_3 (25 %), eine Festphasenextraktion mittels Umkehrphasen-Materials mit großer Porengröße (100 μm) und zusätzliche Zentrifugationsschritte ($12.500 \times g$) in Kombination mit Ausfrieren notwendig, um die Analytik von allen Probenmaterialien zu ermöglichen.

Die neu entwickelte Analysenmethode wurde erfolgreich für die quantitative Bestimmung von PA/PANO in den Endprodukten Weichkäse Typ Picodon, Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego sowie in repräsentativen Probenmatrices aus der Herstellung validiert. Die ermittelten WFR- und RSD-Werte für die unterschiedlichen Analyt-Matrix-Kombinationen waren zum großen Teil innerhalb des Bereichs von 70-140 % mit RSD-Werten von $\leq 20\%$ (SANTE/12682/2019). Aufgrund der strukturellen Vielfalt der PA/PANO und der Komplexität der unterschiedlichen Probenmatrices wurde dies nicht für alle Analyt-Matrix-Kombinationen erreicht. Insbesondere PA/PANO mit einem Chloratom in der chemischen Struktur wiesen eine erniedrigte WFR auf. Trotz der großen Vielfalt und Komplexität der unterschiedlichen Probenmatrices waren die WFR- und RSD-Werte für die jeweiligen PA/PANO, bis auf vereinzelte Ausnahmen, in den unterschiedlichen Matrices vergleichbar (4.2.3.2.). Die Analysenmethode war somit insgesamt für die Beschreibung des Verbleibs von PA/PANO während der Herstellung von Weichkäse Typ Picodon, Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego als geeignet einzustufen.

Bisher wurden lediglich wenige analytische Methoden für die Bestimmung von PA/PANO in Milchprodukten publiziert. In einigen dieser Publikationen war nur eine geringe Anzahl an PA/PANO mit hohen Nachweisgrenzen im Käse untersucht worden (Griffin 2014; Yoon et al. 2015). In anderen Studien wurde der Schwerpunkt auf andere Probenmatrices gelegt, sodass weder eine Kalibrierung in der Käsematrix noch eine Methodvalidierung für Käse vorgenommen wurde (Mulder et al. 2015; Chung & Lam 2017). In der Studie von de Nijs et al. (2017) über den Verbleib von PA/PANO während der Herstellung von Milchprodukten wurden ebenfalls keine gesonderten Angaben zur Linearität oder Wiederfindung der PA/PANO in den komplexeren Probenmatrices angegeben. In diesen Studien wurde das Prinzip der Standardaddition zur Quantifizierung der PA/PANO genutzt. Da im PA-SAFE-FEED-Projekt für alle beprobten Matrices ein analog hergestelltes Blindmaterial verfügbar war, konnte eine externe Matrixkalibration zur PA/PANO-Bestimmung angewendet werden.

Aufgrund der in diesem Projekt erlangten Ergebnisse, ist eine Übertragung der Validierungsergebnisse von Milch auf unterschiedliche Matrices aus der Käseherstellung nicht zu empfehlen. Ursachen hierfür sind u.a. die höheren Trockenmasseanteile in Käseprodukten im Vergleich zur Milch sowie Veränderungen des Stoffprofils, welche durch die Fermentationsprozesse und die Lagerung getrieben sind. Insbesondere für Jaconin sind in der Literatur keine Validierungsdaten bekannt. In der bisher einzigen Studie, welche Jaconin in Käse untersuchte, wurde Jaconin mittels des strukturell unterschiedlichen Jacobin quantifiziert (de Nijs et al. 2017).

Jacobin enthält an der Position, an welcher Jaconin ein Chloratom besitzt, einen Epoxidring. Die in diesem Projekt erhobenen Daten zeigten deutlich, dass sich insbesondere die Signalintensitäten und die Wiederfindungsraten von Jaconin und Jacobin stark unterschieden.

5.2.3.2. Verhalten von PA/PANO während der Herstellung von Milchprodukten

Über das Vorkommen von PA/PANO in Milchprodukten ist wenig bekannt. In einer Studie zum Vorkommen von PA/PANO in Lebensmitteln aus Handel in Hongkong wurden in zwei von sechs Käseproben und drei von sechs Joghurtproben PA/PANO-Gesamtgehalte bis zu 0,048 µg/kg bzw. 0,0070 µg/kg bestimmt (Chung & Lam 2017). In einer europaweiten Studie wurden dagegen in keiner der 34 Käseproben und 27 Proben von fermentierten Milchprodukten PA/PANO über dem LOD detektiert (Mulder et al. 2018). Daten zum Verhalten von PA/PANO während der Herstellung, wie diese im Rahmen dieses Projektes erhoben wurden, geben somit wichtige Anhaltspunkte für die Abschätzung einer möglichen Exposition des Verbrauchers mit PA/PANO durch Milchprodukte.

Pasteurisierung und Hoherhitzung

Als ersten Schritt in der Käseherstellung wurden die Kuh-, Ziegen- und Schafmilch pasteurisiert (Abbildungen 2 bis 4). Der Einfluss der Erhitzung im Rahmen einer Pasteurisierung konnte so für die natürlich kontaminierte Milch untersucht werden. Aus technischen Gründen konnte die Zugabe der PA/PANO für die künstliche Kontamination erst nach der Pasteurisierung erfolgen.

Bei der natürlich kontaminierten Milch wurde die Veränderung des PA/PANO-Gesamtgehalts wesentlich durch die Veränderung des Jaconin-Gehalts bestimmt, da Jaconin den mit Abstand größten Anteil am PA/PANO-Gesamtgehalt ausmachte. Der Grund dafür ist die PA/PANO-Zusammensetzung, die sich aus dem Transfer nach der Extraktgabe in die Milch ergibt (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I).

Für jede Tierart war der PA/PANO-Gesamtgehalt in der Rohmilch und der pasteurisierten Kesselmilch vergleichbar (4.2.3.1., 4.2.3.2.). Die durchgeführte Pasteurisierung (Bedingungen: 72 °C, 13 s) führte somit insgesamt zu keiner Verringerung des PA/PANO-Gehaltes in der Milch. Das stimmt mit den Ergebnissen von de Nijs et al. (2017) überein. Auch diese Arbeitsgruppe beobachtete bei der Pasteurisierung (76 °C, 15 s) keine Abnahme der enthaltenen PA/PANO-Konzentration.

Im Rahmen der Joghurtherstellung aus natürlich kontaminierter Kuh- und Ziegenmilch konnte auch der Einfluss einer Kombination aus Homogenisierung (Bedingungen: 60 °C, 250/50 bar) und anschließender Hoherhitzung (Bedingungen: 92 °C, 300 s) untersucht werden. Während der PA/PANO-Gesamtgehalt bei der Behandlung der Kuhrohmilch stabil war, war bei den Experimenten mit Ziegenrohmilch der PA/PANO-Gesamtgehalt in der hoherhitzten Joghurtmilch (Ausgangsmilch) gegenüber der Rohmilch etwas verringert (4.2.3.1., 4.2.3.2.). In der von de Nijs et al. (2017) durchgeführten Studie wurde keine Reduktion der PA/PANO-Konzentration durch UHT-Behandlung (Ultra-Hochtemperaturbehandlung, 140°C, 4 s) der Milch beobachtet.

Es ist somit davon auszugehen, dass ein möglicher PA/PANO-Gehalt einer Rohmilch nicht oder in sehr geringem Maß durch Erhitzungsverfahren, wie diese auch für Konsummilch angewendet werden, verringert wird. Dies deckt sich mit dem Vorkommen von PA/PANO in Milchproben aus dem Handel (Mulder et al. 2018; Chung & Lam 2017; Huybrechts & Callebaut 2015).

Joghurt

Die Stabilität von PA und PANO unterschied sich während der Joghurtherstellung deutlich. Alle hergestellten Joghurts wurden mit der gleichen Starterkultur gesäuert. Nach der Joghurtherstellung aus künstlich kontaminierter Kuhmilch wurden für die zehn eingesetzten PA 57 ± 17 % bis 86 ± 22 % der ursprünglich in der Ausgangsmilch (hoherhitzte Joghurtmilch) vorhandenen PA-Konzentration detektiert. Auch bei der Herstellung mit natürlich kontaminierter Milch aus dem Transferversuch mit Kühen wurden am Ende der Reifezeit von sieben Tagen noch 81 ± 6 % des PA/PANO-Gesamtgehalts der Ausgangsmilch im Joghurt detektiert. Damit stimmen die Daten aus den Experimenten mit Kuhmilch für beide Kontaminationsarten gut überein. In den Versuchen mit Ziegenmilch lagen die relativen Anteile der PA/PANO-Gehalte bezogen auf den PA/PANO-Gehalt der Ausgangsmilch dagegen mit 90 ± 5 % bis 142 ± 3 % (künstliche Kontamination) und 109 ± 4 % (natürliche Kontamination) höher.

Welche Faktoren zu einem Anstieg auf vereinzelt bis zu $142 \pm 3 \%$ (Abbildung 10) führte, ist zum jetzigen Stand ungeklärt. Das Verhalten von Jacolin, welches den größten Anteil am PA/PANO-Gesamtgehalt in den Produkten aus natürlich kontaminierter Milch ausmacht, stimmte bei beiden Kontaminationsarten überein.

In der Studie von de Nijs et al. (2017) wurde eine Abnahme auf 73% des PA/PANO-Gehalts bei der Herstellung von Joghurt gegenüber der natürlich kontaminierten Kuhmilch bestimmt. Die quantitative Bestimmung erfolgte hierbei mittels Standardaddition im Einfachansatz. Im Kontrast dazu, wurde dies in der vorliegenden Arbeit als Doppelbestimmung aus je drei Chargen pro Produkt mittels externer Kalibration durchgeführt. Es ist zudem anzumerken, dass sich die untersuchten PA/PANO zwischen beiden Arbeiten teilweise unterschieden.

Im Besonderen wurden von de Nijs et al. (2017) zusätzlich Otsenin und Dehydrojacolin untersucht. Diese kamen in vergleichbaren Konzentrationen wie Jacobin in der natürlich kontaminierten Ausgangsmilch vor. Von de Nijs et al. (2017) wurde als mögliche Ursache für den verringerten PA-Gehalt im Joghurt ein möglicher Abbau der PA durch den mikrobiologischen Fermentationsprozess angeführt, da PA als säurestabil gelten.

Um dies zu überprüfen, wurde im Rahmen des durchgeführten Projekts parallel zum Joghurt ein Kontrollprodukt (Milchgel), ohne Fermentation jedoch mit Säuerung, hergestellt. Die Herstellung des Milchgels erfolgte durch chemische Säuerung mit GDL, wodurch der vergleichbare pH-Wert im finalen Produkt eingestellt wurde. Bei einem PA-Abbau, der einzig durch die Fermentation und nicht durch die Säuerung verursacht wird, müsste der PA-Gehalt im Joghurt im Vergleich zum Milchgel deutlich verringert sein. Die hier erhobenen Daten ergeben jedoch für PA kein einheitliches Bild. Teilweise wurden Unterschiede in den Gehalten einzelner PA im Joghurt gegenüber dem chemisch gesäuerten Kontrollprodukt bestimmt, jedoch trat dies zwischen den beiden Kontaminationsarten (natürlich, künstlich) und Tierarten (Kuh, Ziege) nicht oder nur teilweise übereinstimmend auf. Beispielsweise waren bei künstlicher Kontamination von Kuh- und Ziegenmilch die relativen Anteile des Jacolin-Gehalts im Vergleich zur Ausgangsmilch im Joghurt und dem Milchgel vergleichbar. Im Gegensatz dazu war bei der natürlichen Kontamination der relative Anteil des Jacolin-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch im Joghurt für Kuhmilch geringer und für Ziegenmilch höher als im Milchgel. Folglich können keine eindeutigen Trends dazu beschrieben werden, wie sich der PA-Gehalt bei der Fermentation, in Abgrenzung zur Säuerung, verhält.

Im Gegensatz dazu war, der Senecionin-*N*-Oxid-Gehalt im Joghurt gegenüber der Ausgangsmilch und dem Milchgel in den Experimenten mit künstlich kontaminierter Kuh- und Ziegenmilch deutlich verringert. Der gleichzeitige Anstieg der korrespondierenden freien Base Senecionin deutet auf eine Reduktion des PANO zum PA hin. Da dies nur im Joghurt, jedoch nicht im chemisch angesäuerten Kontrollprodukt mit einem vergleichbaren pH-Wert, beachtet wurde, weist dies auf mikrobielle Prozesse während der Fermentation als Ursache für die Reduktion des PANO zum PA hin. Die Quantifizierung des Senecionin im Joghurt aus Ziegenmilch ergab, dass in Abhängigkeit der Charge 62 - 71 % des Verlusts von Senecionin-*N*-Oxid durch eine Reduktion zur freien Base Senecionin erklärbar sind. Der Anteil an Senecionin-*N*-Oxid/Senecionin im Joghurt lag bei 80 - 82 % im Vergleich zur Ausgangsmilch und lag somit auf einem ähnlichen Niveau wie es bei den einzelnen anderen zu dotierten PA der Fall war.

Die Daten von Jacolin-*N*-Oxid und Jacobin-*N*-Oxid im Rahmen der Joghurtherstellung aus natürlich kontaminierter Milch bestätigen die Verringerung des PANO-Gehalts während der Fermentation. Ob auch Jacolin-*N*-Oxid und Jacobin-*N*-Oxid jeweils zu den PA Jacolin und Jacobin reduziert wurden, konnte jedoch nicht erfasst werden, da die PANO in der natürlich kontaminierten Milch nur mit einem sehr geringen Gehalt im Vergleich zu den korrespondierenden PA enthalten waren. In der Studie von de Nijs et al. (2017) war die Abnahme von PA und PANO während der Fermentation vergleichbar. Somit wurden keine gesonderten Effekte der Fermentation auf die PANO beschrieben. Zu berücksichtigen ist auch hier, dass die untersuchten PANO im Gegensatz zu den PA zu geringen Anteilen in der Ausgangsmilch enthalten waren. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und de Nijs et al. (2017) könnte die Verwendung von verschiedenen Starterkulturen, die in Menge und Verhältnis der enthaltenen Milchsäurebakterien variieren, für den Joghurt sein.

PANO wurden als instabil während der Lagerung von Honig beschrieben. Im Honig wurde jedoch bei Verringerung der PANO-Gehalte kein gleichzeitiger Anstieg der Gehalte der korrespondierenden PA detektiert (Gottschalk et al. 2018; Kaltner et al. 2018). Eine Abnahme des PANO-Gehalts wurde ebenfalls nach der Fermentation während der Silierung von Grasschnitt beschrieben. In den Silagen wurden geringfügig höhere PA-Gehalte im Vergleich zum Ausgangsmaterial beschrieben, jedoch konnten diese nur einen geringen Anteil des Verlusts an PANO erklären (Gottschalk et al. 2015). So steht die Reduktion von PANO zum PA, bedingt durch Fermentation, wie in der vorliegenden Projektarbeit, im Kontrast zum Abbau der PANO bei der Lagerung von Honig und Silierung von Grasschnitt.

Auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse zur Joghurtherstellung aus mit PA/PANO kontaminierter Milch ist von keiner relevanten Verringerung des PA/PANO-Gesamtgehaltes während der Joghurtherstellung auszugehen. Abhängig von den konkreten Fermentationsbedingungen kann es zur Reduktion von PANO zum korrespondierenden PA kommen.

Schnittkäse Typ Edamer

Die bestimmten PA/PANO-Gehalte im Schnittkäse Typ Edamerwaren als semiquantitativ einzuordnen. Deshalb ist die Aussagekraft der Veränderungen im PA/PANO-Gehalt im Verlauf der Herstellung eingeschränkt. Dies ist im Folgenden zu berücksichtigen. Insgesamt ist der Verbleib der PA/PANO-Gehalte während der Herstellung von Schnittkäse Typ Edamer zwischen künstlich und natürlich kontaminierter Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) vergleichbar. Die Verteilung der PA auf die unterschiedlichen Stoffströme kann nicht gesichert beurteilt werden.

Im finalen Produkt (Käse nach 56 Tagen Reifung) war eine Tendenz zu einem verringertem PA/PANO-Gehalt in allenChargen erkennbar. Die für den Schnittkäse Typ Edamer ermittelten Daten decken sich tendenziell mit den Ergebnissen zur Herstellung des Weichkäses Typ Picodon und des Hartkäses Typ Manchego aus kontaminierter Milch (4.2.3.2. und 4.2.3.2.). Die Prozessschritte bei der Herstellung des Schnittkäses Typ Edamer ähneln bis zum Käse nach dem Salzbad insbesondere denen des Hartkäses Typ Manchego.

Vergleichbare Prozesse wurden auch in einer anderen Studie untersucht (de Nijs et al. 2017), in der eine Charge Schnittkäse Typ Gouda aus natürlich kontaminierter Kuhmilch hergestellt wurde. Die bestimmten PA/PANO-Gehalte im Käse vor dem Reifen und den Nebenprodukten (erste und zweite Molke) waren hier während der Herstellung von Schnittkäse Typ Gouda untereinander vergleichbar. Insgesamt wurden 86 % der in der Milch enthaltenen PA/PANO in dem Käse vor dem Reifen und den beiden Molken wiedergefunden. Diese Angabe basierten auf einer Quantifizierung des PA/PANO-Gehalts mittels Standardaddition und einer teilweise geschätzten Massenbilanz. Während der sechswöchigen Reifezeit des Schnittkäses Typ Gouda wurde eine Abnahme des PA/PANO-Gehalts um 38 % vom Käse vor dem Reifen hin zum Endprodukt berichtet (de Nijs et al. 2017). Dies entspricht einem verbleibenden relativen Anteil des PA/PANO-Gesamtgehalts im finalen Produkt Schnittkäse Typ Gouda von 47 % bezogen auf die Ausgangsmilch.

Bei der Herstellung von Schnittkäse Typ Edamer aus künstlich kontaminierter Kuhmilch war eine deutliche Verringerung des Senecionin-*N*-Oxid-Gehalts bei gleichzeitigem Nachweis von Senecionin zu beobachten. Das weist, wie auch schon bei der Joghurtherstellung (5.5.3.2.), auf eine Reduktion von PANO zu PA hin. Bei der Herstellung von Schnittkäse des Typs Gouda in der Studie von de Nijs et al. (2017) wurden ebenfalls keine PANO mehr im Endprodukt nachgewiesen. Allerdings wurde die Abnahme des PANO-Gehalts in der Studie erst innerhalb der ersten beiden Wochen während der Reifung detektiert und nicht schon in den ersten Prozessschritten wie in den vorliegenden Untersuchungen.

Weichkäse Typ Picodon

Insgesamt stimmen die in den Experimenten zur Herstellung von Weichkäse Typ Picodon aus künstlich und natürlich kontaminierter Milch ermittelten relativen Anteile des PA/PANO-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) sehr gut überein (4.2.3.2.).

Zwischen dem jeweiligen PA-Gehalt in der Ausgangsmilch und der Molke wurde kein Unterschied festgestellt. Dies deutet daraufhin, dass sowohl die Fermentation als auch das Einlaben keinen Einfluss auf die PA haben. Ein verringerter relativer Anteil der PA-Gehalte bezogen auf die Ausgangsmilch wurde dagegen im Käse vor dem Salzen beobachtet. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Probe Molke nur den Hauptteil der Molke umfasst, die bereits nach etwa einer Stunde des insgesamt 24 Stunden andauernden Abtropfvorgangs abgenommen wurde. Während der verbleibenden Zeit kam es zu einem vergleichsweise geringen restlichen Verlust von nicht aufgefangener Molke, der jedoch nicht näher bestimmt werden konnte. Die Probe des Käses vor dem Salzen war somit nicht direkt mit der Probe der Molke vergleichbar. Aus diesem Grund konnte nicht vollständig zurückverfolgt werden, ob die beobachtete Verringerung des relativen Anteils des PA/PANO-Gehalts bezogen auf die Ausgangsmilch durch den Verlust von nicht aufgefangener Molke, durch mikrobiologische bzw. chemische Prozesse während des 24-stündigen Abtropfens oder einer Kombination aus beiden bedingt war. Während des Abtropfens finden weiterhin Fermentationsprozesse, sowie eine damit verbundene Verringerung des pH-Werts (4.2.2. und Tabelle 10) statt.

Das Trockensalzen bei dem Weichkäse Typ Picodon hatte keinen Effekt auf die PA. Nach 21 Tagen Reifung war eine vergleichsweise hohe RSD in den relativen Anteilen der jeweiligen Gehalte bezogen auf die Ausgangsmilch zwischen den unterschiedlichen Chargen zu beobachten. Das weist darauf hin, dass im Fall des Weichkäses Typ Picodon der Reifeprozess den PA/PANO-Gehalt im fertigen Produkt beeinflussen kann. Die hierfür relevanten mikrobiellen und damit verbundenen chemischen Prozesse scheinen jedoch unterschiedlich stark abgelaufen sein.

Die für den Weichkäse Typ Picodon (Endprodukt) bestimmten Daten zu Milchinhaltsstoffen und Produktparametern, insbesondere die Trockenmasse bzw. Wassergehalt, wiesen im Vergleich zu den weiteren hergestellten Produkten ebenfalls eine weitaus höhere Variabilität auf (4.2.2.). Die RSD der Trockenmasse der finalen Produkte erklärt die hohe Variabilität der PA-Gehalte im Endprodukt jedoch nicht vollständig.

Im Gegensatz zu den PA war das PANO Senecionin-*N*-Oxid bereits in der Molke und später auch im Käse vor dem Salzen nicht mehr über LOQ nachweisbar. Die festgestellte Umwandlung von Senecionin-*N*-Oxid zu Senecionin wurde daher durch mikrobiologische oder damit verbundene chemische Prozesse schon während des Fermentierens oder des Einlabens verursacht.

Weichkäse Typ Feta

Die Daten zum Verhalten der PA/PANO während der Herstellung von Weichkäse Typ Feta aus künstlich und natürlich kontaminierter Milch bestätigen sich gegenseitig (4.2.3.2.). Der vergleichbare Gehalt von PA in der Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch) und der Molke ist, wie bereits beim Weichkäse Typ Picodon, ein Indikator dafür, dass mikrobiologische Prozesse und damit verbundene chemische Veränderungen keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf PA haben und eine gleichmäßige Verteilung der PA auf die unterschiedlichen Stoffströme stattfindet (5.2.3.2.). Die relativen Anteile der PA-Gehalte waren im Käsebruch sowie im Käse vor dem Salzbad leicht erniedrigt, da die PA vorrangig in der wässrigen Phase der Milch und des Käses vorliegen. Der Wasseranteil im Käse ist gegenüber der Ausgangsmilch um ca. 60 % reduziert.

Maßgeblich für die verringerten relativen Anteile der PA-Gehalte im Weichkäse Typ Feta (Endprodukt) gegenüber der Ausgangsmilch war der Prozess des Salzens im Salzbad. Aufgrund der langen Verweildauer von sieben Tagen sowie der lockeren Konsistenz des Käselaibs wird beim Weichkäse des Typs Feta ein weitreichender Austausch von Stoffen zwischen dem Käselaib und dem Salzbad ermöglicht. Ein geringerer osmotischer Druck des Salzbadetes für den Weichkäse Typ Feta im Vergleich zu Salzbadern für Hart- und Schnittkäse könnte dies noch zusätzlich verstärkt haben. Hierdurch erfolgt eine Migration der PA in das Salzbad, ähnlich einer Dialyse (Floury et al. 2010). Der Nachweis von PA im Salzbad nach der Käseentnahme bestätigen dies (4.2.3.2.).

Eine Berechnung der exakten Wiederfindung der PA-Menge im Salzbad im Vergleich zum Verlust des Verlusts der PA-Menge wäre mit großen Unsicherheiten behaftet und wurde daher nicht vorgenommen. Dies ist bedingt durch Veränderungen der Trockenmassen bzw. der Volumina, sowohl des Salzbad nach Käseentnahme als auch der Käselaibe, sowie der hohen Verdünnung der PA-Gehalte im Salzbad nach der Käseentnahme durch das hohe Volumen. Ebenfalls zu berücksichtigen ist hierbei, dass im experimentellen Aufbau jeweils ein neu angesetztes Salzbad zum Einsatz kam, um reproduzierbar herstellen und Migrationsprozesse für jede Charge separat bestimmen zu können. In Molkereien werden Salzbaden kontinuierlich und chargenübergreifend weiterverwendet. Stattdessen werden unterschiedliche Methoden, wie Filtrationsverfahren, UV-Behandlung und ein Teilaustausch für die Aufrechterhaltung der Qualität des Salzbad angewendet (McSweeney et al. 2017). In welchem Maß potenziell im Salzbad schon vorhandene oder andere niedermolekulare Verbindungen die Migrationsprozesse der PA/PANO zwischen den Käselaiben und dem Salzbad beeinträchtigen, kann im Rahmen dieser Studie nicht beantwortet werden (Floury et al. 2010).

Eine vergleichsweise geringe Standardabweichung der PA-Gehalte zwischen den Chargen bei den Proben des Käses nach 56 Tagen Reifung (4.2.3.2.) ist ein Indikator dafür, dass der Verlust der PA in das Salzbad reproduzierbar zu einer Verringerung der PA/PANO im Endprodukt gegenüber der Ausgangsmilch führte.

Das PANO Senecionin-*N*-Oxid wurde, wie bei den anderen oben genannten Produkten, während der Fermentation oder dem Einlaben abgebaut, sodass es im Weichkäse Typ Feta nicht mehr über LOQ nachweisbar war. Der geringe relative Anteil des PANO in der Molke ist ein Indikator dafür, dass die mikrobiologischen und die damit verbundene chemische Prozesse in diesem Fall zu einem Großteil bereits kurz nach der Zugabe der Starterkultur ablaufen, da zwischen der Zugabe der Starterkultur und dem Abscheiden der Molke etwa zwei Stunden lagen.

Hartkäse Typ Manchego

Der Hartkäse Typ Manchego wies unter den untersuchten Käse-Typen die Besonderheit auf, dass aufgrund der offenen Rinde ein Wasseraustausch möglich war und seine Trockenmasse während der Reifung kontinuierlich anstieg. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Käsen wies der Hartkäse Typ Manchego die höchste Varianz im Verhalten der unterschiedlichen PA auf (4.2.3.2.). Dies spiegelt sich auch in der Spannweite der verbleibenden relativen Anteile von $44,0 \pm 1,7 \%$ (Jacobin) bis $101,5 \pm 2,5 \%$ (Retrorsin)) im Endprodukt wider. Zudem war der Anstieg des Jacolin-Gehalts bezogen auf die Gesamtmasse für die beiden Kontaminationsarten unterschiedlich ausgeprägt (4.2.3.2.).

Durch das Einbeziehen der Änderung der Trockenmasse des Käselaibs konnte der Anstieg des Gehalts bezogen auf die Gesamtmasse des Käselaibs, welche für den Großteil der PA während der 112-tägigen Reifung zu beobachten war, erklärt werden (4.2.3.2.). Bezogen auf die Trockenmasse war effektiv eine Abnahme der relativen Anteile der PA-Gehalte erkennbar. Wodurch diese Abnahme der PA verursacht wurde, ist unbekannt. Eine besonders starke Abnahme war für die PA Jacobin und Erucifolin zu beobachten. Beide PA haben in ihrer Struktur im Gegensatz zu den anderen untersuchten PA eine Epoxidgruppe im Bereich der Necinsäuren im makrozyklischen Ring. In welcher Weise die Epoxidgruppe hierbei den Abbau von Jacobin und Erucifolin begünstigen, und ob möglicherweise toxische Metabolite entstehen, kann anhand der vorhandenen Daten nicht gezeigt werden.

Insgesamt führte der Wasserverlust durch Verdunsten zu einer Erhöhung des PA-Gehalts bezogen auf die Gesamtmasse des Endprodukts, wodurch der relative Anteil des PA-Gehalts im Vergleich zur Ausgangsmilch nicht wie bei den anderen Käsen verringert wurde.

Für die Evaluation des Einflusses des Salzbadetes auf die Änderung des PA/PANO-Gehalts wurden für den Hartkäse Typ Manchego die Proben Käsebruch und Käse nach dem Salzbad herangezogen. Die Probe Käsebruch entspricht dabei jedoch nicht dem grünen Käse vor dem Salzbad, da sich diese in Bezug auf die Trockenmasse (nicht bestimmt für den Käsebruch) stark unterscheiden, weil im Käsebruch die Molke noch nicht vollständig abgetrennt ist. Der grüne Käse vor dem Salzbad konnte beim Hartkäse Typ Manchego aufgrund der technologischen Prozesse nicht beprobt werden. In welchem Maß die Abtrennung der Molke vom Käsebruch hin zum grünen Käse vor dem Salzbad oder das Salzbad die geringe Abnahme des PA-Gehalts vom Käsebruch zum Käse nach dem Salzbad (4.2.3.2.) bedingt haben, bleibt somit offen. Dennoch lässt sich aus den Daten der beiden Proben ableiten, dass im Gegensatz zum Weichkäse Typ Feta, beim Hartkäse Typ Manchego keine deutliche Verringerung des PA-Gehalts während des Salzbadetes stattgefunden hat. Eine Ursache ist die kompaktere Konsistenz und höhere Trockenmasse des Hartkäses Typ Manchego, im Vergleich zum Weichkäse Typ Feta, und eine damit verbundene erschwerte Diffusion der PA/PANO in die flüssige Phase (4.2.2.). Ein weiterer Grund ist die geringere Verweildauer von nur 5 h beim Hartkäse Typ Manchego im Vergleich zu sieben Tagen beim Weichkäse Typ Feta (3.2.1.1.). In der Studie von de Nijs et al. (2017) waren die Bedingungen des Salzens im Salzbad (17,5 % Natriumchlorid, 5 h) während der Herstellung von Schnittkäse Typ Edamer ähnlich zu den Bedingungen, die hier für das Salzbad des Hartkäse Typ Manchego verwendet wurden. Da in der Studie lediglich die Ausgangsmilch aus dieser Studie und der Käse vor der Reifung beprobt wurden, kann der Einfluss des Salzbadetes von de Nijs et al. (2017) nicht gesondert bewertet werden.

Das PANO Senecionin-*N*-Oxid wurde im Hartkäse Typ Manchego während der Herstellung zu Senecionin reduziert. Im Gegensatz zu den weiteren Milchprodukten war Senecionin-*N*-Oxid jedoch in mehreren Proben bis hin zum Käse nach dem Salzbad über LOQ nachweisbar war. Zusammen mit der höheren RSD der relativen Anteile von Senecionin-*N*-Oxid gegenüber den Gehalten in der Ausgangsmilch deutet dies daraufhin, dass die mikrobiologischen und die damit verbundene chemische Prozesse langsamer und mit einer höheren Variabilität ablaufen.

Vergleich des Verhaltens von PA/PANO während der Herstellung von unterschiedlichen Käsesorten

Insgesamt ist für die Bewertung des Verhaltens von PA/PANO bei der Herstellung von Käse zwischen dem Verhalten von PA und PANO zu unterscheiden. Während PANO durch mikrobiologische Prozesse bzw. daraus resultierende chemische Veränderungen reduziert wurden, waren PA weitgehend stabil gegenüber den mikrobiologischen Prozessen während der Herstellung von Käse.

Die relativen Anteile der PA-Gehalte bezogen auf die Ausgangsmilch (pasteurisierte Kesselmilch), deuten darauf hindeuten, dass die Verteilung der PA bei allen Käsesorten bis zum grünen Käse hauptsächlich der Wasserphase folgte. Ein Abbau oder eine Anreicherung darüber hinaus wurde unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Beschaffenheit der Probematerialien nicht in einem relevanten Maß beobachtet. Die weitere Behandlung der Käselaibe zeigte dagegen unterschiedliche Auswirkungen auf die PA-Gehalte. Insbesondere ist hier ein potenzieller Verlust von PA durch die Diffusion in das Salzbad zu nennen. Diese erfolgte für den Weichkäse Typ Feta in einem deutlichen Maß, jedoch nur sehr geringfügig für den Hartkäse Typ Manchego oder den Schnittkäse Typ Edamer. Dies ist ein Indikator, dass Faktoren wie die weiche Konsistenz und eine vergleichsweise geringe Trockenmasse eines Käselaibs sowie eine lange Verweilzeit im Salzbad, wie diese bei dem Weichkäse Typ Feta auftreten, wichtige Einflussfaktoren sind.

Für die Herstellung der verschiedenen Käsesorten wurden ebenfalls stark unterschiedliche Reifebedingungen angewendet. Während sich bei der Herstellung des Weichkäses Typ Picodon der relative Anteil der PA-Gehalte bezogen auf die Ausgangsmilch während der Reifung nicht änderte, war bei der Herstellung des Hartkäses Typ Manchego und des Weichkäses Typ Feta ein Anstieg für die Vielzahl der PA zu beobachten. Für den Hartkäse Typ Manchego erklärte ein starker Anstieg der Trockenmasse während der Reifung die Konzentrierung der PA bezogen auf die Gesamtmasse des finalen Produkts.

Korrigiert mit der Trockenmasse nahm für die meisten PA der relative Anteil des Gehalts während der Reifezeit des Hartkäse Typ Manchego von 112 Tagen auf $81,8 \pm 0,1 \%$ bis $89,3 \pm 7,5 \%$, bezogen auf den jeweiligen PA-Gehalt im Käse vor der Reifung, geringfügig ab. Lediglich PA mit einer Epoxidgruppe in der chemischen Struktur wurden deutlich verringert (4.2.3.2.). Wodurch die beobachtete geringe Abnahme der PA während der Reifung des Hartkäse Typ Manchego bedingt war und weshalb die PA mit einer Epoxidgruppe sich in ihrem Verhalten während der Reifung von den anderen PA unterschieden, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Weiterführende Untersuchungen zur Identifizierung von Metaboliten, insbesondere von Jacobin, könnten Hinweise hierauf ermöglichen. Insgesamt waren die relativen PA-Gehalte im Endprodukt jedoch ein Indikator dafür, dass PA nicht in einem relevanten Maß durch mikrobiologische Prozesse während der Reifung abgebaut werden. Dem gegenüber steht der physikalische Effekt der Verdunstung, welcher während der Reifung zu einer Konzentrierung der PA bezogen auf die Gesamtmasse führte. Basierend auf dem Gesamtgewicht eines Produkts werden auch Verzehrsmengen durch Verbraucher ermittelt. Daher ist das Gesamtgewicht auch ein wichtiger Bezugspunkt für die Berechnung der Exposition des Verbrauchers mit PA/PANO im Rahmen der Risikobewertung.

Während der Reifezeit von 56 Tagen für den Weichkäse Typ Feta ändert sich die Trockenmasse nicht (Daten nicht gezeigt), weshalb dies als Ursache für die beobachtete Erhöhung des PA-Gehalts gegenüber dem Käse vor der Reifung ausgeschlossen werden konnte. Inwiefern hierbei mikrobiologische und chemische Prozesse eine Freisetzung von zuvor adhären oder gebundenen PA eine Rolle spielen könnten, kann nicht eingeordnet werden. Die semiquantitativ zu bewertenden Ergebnisse des Schnittkäses Typ Edamer deuten hingegen die Tendenz zur Verringerung des PA/PANO-Gehalts während der Reifung an. Auch de Nijs et al. (2017) beobachteten eine Verringerung des PA/PANO-Gesamtgehalts um 38 % während der Reifung eines Schnittkäses des Typs Gouda aus natürlich kontaminierter Milch.

Der Abbau von PANO, insbesondere Senecionin-*N*-Oxid, durch mikrobielle Aktivität wurde über alle Produkte hinweg beobachtet. Während bei der Joghurtherstellung im Endprodukt noch PANO vorhanden waren, wurden bei der Käseherstellung die PANO vollständig abgebaut. Generell ist zu berücksichtigen, dass in der natürlich kontaminierten Milch PANO nur zu einem kleinen Prozentsatz am PA/PANO-Gesamtgehalt vorhanden waren, wobei zusätzlich die korrespondierenden PA in hohen Gehalten auftraten (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I).

Aus diesem Grund konnte die für Senecionin-*N*-Oxid beobachtete Reduktion vom PANO zum PA, nicht für die PANO in der natürlich kontaminierten Milch nachgewiesen werden, da die daraus resultierende Zunahme der PA bereits innerhalb des Schwankungsbereichs für die jeweiligen PA-Gehalte lagen (siehe „Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren“ Abschlussbericht Arbeitspaket I; 4.2.3.1., 4.2.3.1.). Es wurde jedoch beobachtet, dass auch während der Herstellung der vier Käsesorten aus natürlich kontaminierter Milch ein Abbau der PANO bis jeweils unter LOQ in den Endprodukten erfolgte. Ob die Stoffgruppe der PANO im Allgemeinen durch Fermentation mit Starterkulturen zum jeweils korrespondierenden PA reduziert werden und in welchem Maß dies für PANO mit unterschiedlicher chemischer Struktur stattfindet, kann aus den erhobenen Daten nicht abgeleitet werden. Basierend auf der für Senecionin-*N*-Oxid beobachteten Reduktion zur freien Base, kann nicht von einer Detoxifizierung ausgegangen werden.

In der bisher einzigen veröffentlichten Studie zum Verhalten von PA/PANO in Milchprodukten (de Nijs et al. 2017) wurde natürlich kontaminierte Kuhmilch zur Herstellung von Joghurt und Schnittkäse Typ Gouda verwendet. Der Käse nach dem Salzbad enthielt noch das PANO Jacobin-*N*-Oxid in vergleichbaren Gehalten wie in der verwendeten Ausgangsmilch. Ein Abbau der PANO wurde hier während der Reifezeit des Schnittkäse Typ Gouda beobachtet. Während der Joghurtherstellung wurde jedoch keine Abnahme des PANO-Gehalts beobachtet (de Nijs et al. 2017).

Über alle untersuchten Herstellungsprozesse hinweg waren die in den Molken bestimmten PA/PANO-Gehalte stets vergleichbar mit denen der jeweiligen Ausgangsmilch (4.2.3.2.). In Hinblick auf den Einsatz von Molke als Futtermittel oder in der Produktion weiterer Lebensmittel sollte berücksichtigt werden, dass PA auf diesen Weg möglicherweise wieder in die Lebensmittelkette eingetragen werden können. Bisher wurden kaum molke- oder molkenpulverbasierte Lebens- oder Nahrungsergänzungsmittel auf das Vorkommen von PA untersucht. In einer europaweiten Studie wurden in 25 Proben Säuglingsanfangsnahrung keine PA über dem LOD nachgewiesen (Mulder et al. 2018).

6. Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse

Es wurde eine Statuserhebung zur Abbildung der aktuellen PA/PANO-Belastung in Milch durchgeführt sowie der Verbleib von PA/PANO bei der Herstellung ausgewählter Milchprodukte (Flüssigmilch, Joghurt, Käse) untersucht, um eine Grundlage für nachfolgende Bewertungen und Ableitungen zu liefern, inwieweit der Bewuchs von Kreuzkraut auf Grünland tolerabel ist oder nicht. Diese Ableitungen sollen hinsichtlich der Tiergesundheit und Risiken für die menschliche Gesundheit beim potenziell PA/PANO-Transfer in Milch und Milchprodukte möglich sein. Somit wird durch das Projekt ein Beitrag zur Entwicklung von Strategien zur Verbesserung der Tiergesundheit und des Tierwohls sowie zur Verbesserung der Qualität tierischer Erzeugnisse geleistet.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Zum Projektbeginn war bekannt, dass Milch aus dem Einzelhandel mit PA/PANO belastet sein können (Huybrechts & Callebaut 2015; Mulder et al. 2015). Ziel war es aufzuklären, wie genau es zu dieser Kontamination kommt, ob PA/PANO durch Vermischen von hochbelasteter Milch von wenigen Einzelbetrieben mit unbelasteter Milch von zahlreichen anderen Betrieben in Molkereien eingetragen werden. Infolgedessen sind geringe Kontaminationen in der gesamten Milch aus der Molkerei vorhanden. Andererseits war eine mögliche Ursache auch, dass die Milch vieler Einzelbetriebe bereits vor der Molkerei mit geringen PA/PANO-Kontaminationen belastet sind. In der durchgeführten Statuserhebung wurden 228 Milchproben aus zwei Modelregionen in verschiedenen Saisons beprobt und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der Milchproben der beprobten Betriebe keine PA/PANO-Kontamination aufwies. Zusätzlich gab es wenige stark belastete Milch von Einzelbetrieben.

Es wurden zudem sowohl ökologisch als auch konventionell wirtschaftende Milchbetriebe beprobt, um die Frage zu klären, ob ökologische Milchbetriebe, welche bestimmten Einschränkungen bei der Unkrautbekämpfung unterliegen, höhere PA/PANO Kontaminationen in der Milch aufweisen. Die Daten zeigen, dass der Anteil an PA/PANO-Kontaminationen in Milch aus ökologischen Milchbetrieben höher ist im Vergleich zu konventionellen Milchbetrieben. Im Kontrast dazu, stammte die am stärksten belastete Milchprobe jedoch aus einem konventionellen Betrieb. Somit zeigt sich, dass nicht pauschal gesagt werden kann, ob ökologisch oder konventionell wirtschaftende Milchbetriebe allgemein zu mehr oder weniger PA/PANO-Belastungen in der Milch führen. PA/PANO-haltige Pflanzen treten ubiquitär auf und eine Sensibilisierung aller Milchbetriebe ist entsprechend wichtig.

Neben der Beprobung der Milch sollten auch die verfütterten Futtermittel des zugehörigen Betriebes beprobt werden. Es stellte sich jedoch im Laufe der Durchführung heraus, dass die Probennahmen der Futtermittel nicht repräsentativ möglich waren. PA/PANO-Kontaminationen in Raufuttermitteln werden insbesondere durch einzelne PA/PANO-haltige Pflanzen bzw. Pflanzenteile verursacht, die inhomogen in Futtermitteln vorkommen können. Aufgrund der Inhomogenität und großen Futtermittelmengen, kann basierend auf nicht repräsentativen Proben keine belastbare Aussage über das Vorhandensein von PA/PANO im Futter der Tiere getroffen werden. Zudem waren Informationen zu den Aufnahmemengen der Milchkühe sowie die Bezugsquellen, Herstellung und Lagerung der Futtermittel schwierig zu erhalten und zudem kaum unter den Milchbetrieben vergleichbar.

Da ein Teil der Proben von Milchtankstellen stammt, war hier auch gar keine Probennahme bei den Futtermitteln möglich. Deshalb wurde die geplante PA/PANO-Analytik für die Futtermittel verworfen. Durch die entwickelte sensitive PA/PANO-Multimethode mit über 50 Analyten, war es jedoch möglich durch das PA/PANO-Profil in den kontaminierten Milchproben Rückschlüsse auf die ursächliche Pflanzenart zu ziehen. Es zeigten sich zwischen den Modelregionen Bayern und Schleswig-Holstein unterschiedliche PA/PANO-Profile. In der Milch aus Schleswig-Holstein trat Jacolin am häufigsten auf, was für eine Exposition von Milchkühen gegenüber Kreuzkräutern (Asteraceae) spricht. In der Milch aus Bayern waren vor allem Lycopsamin und Senkirkin zu finden, was für eine Exposition gegenüber Boraginaceae (Raubblattgewächse) und Asteraceae (Korbblütler) spricht.

Bezüglich Milchprodukte war zum Projektbeginn bekannt, dass ein Übergang von PA/PANO aus der Milch in Milchprodukte möglich ist (de Nijs et al. 2017). Da nur sehr wenig Probenmaterial als Grundlage für die Studie von de Nijs et al. (2017) zur Verfügung stand, ließen sich hier nur erste Tendenzen und Erkenntnisse zur Stabilität von PA/PANO während der Verarbeitung von boviner Rohmilch zu Konsummilch, Joghurt und Schnittkäse ableiten. Insbesondere zu Produkten, die aus der Milch von kleinen Wiederkäuern hergestellt werden, waren keine Daten verfügbar. Die Milch von kleinen Wiederkäuern wird jedoch oftmals im Rahmen der Direktvermarktung durch den Erzeuger verarbeitet und in Form von Milchprodukten an Verbraucher abgegeben. Hierdurch wird möglicherweise belastete Milch ohne weitere Verdünnung durch Milchen von anderen Erzeugern verarbeitet, weshalb hier das Risiko eines PA/PANO-Vorkommens höher erscheint.

Das Ziel des Arbeitspakets III war es daher weitergehende Erkenntnisse über den Verbleib von PA/PANO bei der Herstellung von unterschiedlichen Milchprodukten aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch zu erhalten. Hierfür wurden natürlich kontaminierte Milch, die aus den Transferstudien mit Kühen, Schafen und Ziegen erhalten wurde, und Milch, die vorab künstlich mit PA/PANO kontaminierte wurde, zu typischen Produkten verarbeitet. Die Produkte wurden vor Projektbeginn aufgrund von Unterschieden in der Herstellung und deren Angebot durch Direktvermarkter ausgewählt. Aus Kuhmilch wurde Joghurt (inkl. eines chemisch gesäuerten Kontrollprodukts) und Schnittkäse Typ Edamer hergestellt, aus Schafmilch Weichkäse Typ Feta und Hartkäse Typ Manchego und aus Ziegenmilch Joghurt (inkl. eines chemisch gesäuerten Kontrollprodukts) und Weichkäse Typ Picodon in jeweils drei Chargen pro Kontaminationsart. Zusätzlich wurde das für die PA/PANO-Analytik notwendige Blindmaterial hergestellt. Im Anschluss wurden das jeweilige fertige Produkt, die Ausgangsmilch, ausgewählte relevante Prozesszwischenstufen sowie Nebenströme analysiert.

Die im Rahmen des Projekts entwickelten Analysemethoden ermöglichten eine semiquantitative Bestimmung der PA/PANO in den Proben aus der Herstellung von Schnittkäse Typ Edamer und die quantitative Bestimmung der PA/PANO in den Proben aus der Herstellung von Joghurt, Weichkäse Typ Feta, Hartkäse Typ Manchego und Weichkäse Typ Picodon. Die Erkenntnisse aus der PA/PANO-Analytik in Schnittkäse Typ Edamer haben dazu beigetragen die Analysenmethode im Projektverlauf zu optimieren, sodass eine quantitative Bestimmung der PA/PANO für die Proben aus der Herstellung von Weichkäse Typ Feta, Hartkäse Typ Manchego und Weichkäse Typ Picodon erreicht werden konnte.

Durch die Herstellung von Produkten aus künstlich kontaminierter Milch sollte sichergestellt werden, dass die PA/PANO-Konzentrationen in der Ausgangsmilch ausreichend für eine Nachverfolgung der PA/PANO über den gesamten Prozess sind und möglicherweise relevante Abbauprodukte bestimmbar wären. Die künstliche Kontamination ermöglichte zusätzlich die Einbindung von PA, die von anderen Pflanzenarten als *J. vulgaris* Gaertn. gebildet werden, wie z. B. PA aus der Gruppe der Monoester und offenen Diester. Die Gesamtaussagekraft der Studie konnte somit erweitert werden, ohne dass die Kosten der Messung für die Analytik selbst gestiegen sind. Mittels der künstlichen Kontamination konnte beobachtet werden, dass bis auf einzelne Ausnahmen, die für den jeweiligen Prozess festgestellten Effekte auf PA unterschiedlicher Struktur in gleicher Weise auftreten. Im Gegensatz zu den PA wurde das PANO während der Herstellung fermentierter Milchprodukte deutlich abgebaut. Durch die hohe Ausgangskonzentration und das chemisch gesäuerte Kontrollprodukt im Rahmen der Joghurtherstellung wurde beobachtet, dass während der Fermentation eine Reduktion von Senecionin-*N*-Oxid zu Senecionin stattfand.

In der Milch aus den Transferversuchen war bei allen drei Tierarten der PA/PANO-Gehalt der Hauptanalyten in einer Konzentration vorhanden, die eine Nachverfolgung über die gesamte Herstellung hinweg ermöglichte. Dies war im Vorfeld des Versuchs nicht absehbar, ermöglichte jedoch, insbesondere für Jacolin, einen direkten Vergleich der Ergebnisse für die natürliche und künstliche Kontaminationsart. Die Daten für die beiden Kontaminationsarten stimmten hierbei sehr gut überein. Durch die Verwendung von natürlich kontaminierter Milch konnte ein realitätsnahes PA/PANO-Profil untersucht und die Milch aus den Transferversuchen für eine weiterführende Forschungsfragestellung genutzt werden.

Durch die systematische Untersuchung der Herstellung von Milchprodukten aus den Milchen von drei Tierarten und den technischen Wiederholungen, wurde eine große Datengrundlage generiert. Die Ergebnisse dieser Studie können somit dazu beitragen, das Risiko einer PA/PANO-Kontamination von unterschiedlichen Milchprodukten im Fall einer Verarbeitung von PA/PANO-belasteter Milch abschätzen zu können.

8. Zusammenfassung

8.1. Gewinnung und Untersuchung von Feldproben, Statusanalyse

Es wurde eine Vielfalt an PA/PANO des Sc-Typs (Asteraceae), des Ly-Typs (Boraginaceae), und des Ht-Typs (Boraginaceae) in den Milchproben nachgewiesen. Jacolin, Lycopsamin und Senkirkin kamen dabei am häufigsten vor. In den hoch belasteten Milchproben aus Schleswig-Holstein sind die PA/PANO-Muster ähnlich denen, die in den vorliegenden Transferstudien mit Jakobskreuzkraut-Extrakt gefunden wurden.

Insgesamt sind die PA/PANO-Kontaminationsraten in Milch direkt vom Erzeugerbetrieb mit denen aus dem Einzelhandel vergleichbar. Allgemein sind die PA/PANO-Kontaminationsraten gering, dies gilt auch für Milch aus Regionen die bekannterweise eine Weiteverbreitung an PA/PANO-haltigen Pflanzen haben. Die Hypothese, dass die PA/PANO-Konzentrationen in Milch aus Einzelbetrieben potenziell höher sind als in Milch aus Molkereien wird durch diese Studie gestützt. Vereinzelt gab es Milchproben mit hohen PA/PANO-Gesamtgehalten, die bis zu 30-mal höher waren als die zuvor für Milch aus dem Einzelhandel berichteten. Gelegentlich auftretende hohe Konzentrationen bei wenigen Einzelbetrieben scheinen eher für die PA/PANO-Kontamination von Konsummilch verantwortlich zu sein als häufig auftretende niedrige Konzentrationen in der Milch von vielen Betrieben.

8.2. Herstellung und Untersuchung von Milchprodukten

Es wurden die Milchprodukte Joghurt, Schnittkäse Typ Edamer, Hartkäse Typ Manchego, Weichkäse Typ Feta und Weichkäse Typ Picodon aus natürlich und künstlich mit PA/PANO kontaminierter Milch hergestellt. Die Ausgangsmilch, die finalen Produkte, ausgewählte Prozesszwischenstufen und Nebenströme wurden hinsichtlich des Verbleibs von PA/PANO analysiert.

PA und PANO unterschieden sich in ihrer Stabilität und Verbleib während der Herstellungsprozesse. PA waren weitgehend stabil gegenüber den thermischen, mikrobiologischen und chemischen Veränderungen während der Herstellung von Käse und Joghurt. Die Verteilung der PA folgte zum großen Teil analog zur wässrigen Phase, wodurch auch die Molke in gleichem Maß kontaminiert war wie die Ausgangsmilch. Je nach Käsesorte beeinflussten der Stoffaustausch im Salzbad und die Reifung der Käselaike den verbleibenden Anteil der PA im finalen Produkt bezogen auf die Ausgangsmilch unterschiedlich stark. Faktoren wie die Konsistenz, Trockenmasse und die Dauer des Salzens und der Reifung waren hierbei relevant.

Bis auf einzelne Ausnahmen traten die für den jeweiligen Herstellungsprozess festgestellten Effekte für strukturell unterschiedliche PA in gleicher Weise auf.

PANO waren in den Endprodukten der Herstellungsprozesse nicht mehr oder deutlich verringert nachweisbar. Mittels der künstlichen Kontamination wurde anhand von Senecionin-*N*-Oxid eine Reduktion des PANO zum korrespondierenden PA durch Fermentationsprozesse beobachtet.

Insgesamt zeigte sich, dass die Verarbeitung von kontaminierter mit PA/PANO-kontaminierter Milch auch zu ähnlich kontaminierten Milchprodukten und Nebenströmen (Molke) führte.

9. Literaturverzeichnis

Anonymous (2010). Chemische, physikalische und mikrobiologische Untersuchungsverfahren für Milch, Milchprodukte und Molkereihilfsstoffe. 7th ed. VDLUFA-Verlag, Darmstadt.

Anonymous (2013). Milk and milk products – Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. ISO 9622 IDF 141. International Organization for Standardization, Geneva.

Arrigo, Y., & Frioud, E. (2021). Fütterungsempfehlungen für die Ziege. Acroscope, Posieux.

BfR. (2011). Opinion No. 038/2011: Chemical analysis and toxicity of pyrrolizidine alkaloids and assessment of the health risks posed by their occurrence in honey. In: Berlin: BfR (Federal Institute for Risk Assessment).

BfR. (2021). Bestimmung von Aflatoxin M1 und Ochratoxin A in Hart- und Weichkäse mittels LC-FLD und LC-MS/MS. Prüfvorschrift. BfR (Federal Institute for Risk Assessment).

Birk, B., Staehle, A., Meier, M., Palm, M., Funk-Weyer, D., Breves, G., & Seulberger, H. (2018). Investigation of Ruminant Xenobiotic Metabolism in a modified rumen simulation system (RUSITEC). *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 35(3), 379-389.

Brown, A. W., Stegelmeier, B. L., Colegate, S. M., Gardner, D. R., Panter, K. E., Knoppel, E. L., & Hall, J. O. (2016). The comparative toxicity of a reduced, crude comfrey (*Symphytum officinale*) alkaloid extract and the pure, comfrey-derived pyrrolizidine alkaloids, lycopsamine and intermedine in chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Applied Toxicology*, 36(5), 716-725.

Casado, N., Morante-Zarcelo, S., & Sierra, I. (2022). Application of the QuEChERS Strategy as a Useful Sample Preparation Tool for the Multiresidue Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Food and Feed Samples: A Critical Overview. *Applied Sciences*, 12(9), 4325.

CCCF. (2013). Discussion Paper on Management Practices to Reduce Exposure of Food-Producing Animals (Livestock and Bees) to Pyrrolizidine Alkaloids and to Reduce Presence of Pyrrolizidine Alkaloids in Commodities (Raw and Processed). Codex Committee on Contaminants in Foods.

Chizzola, R., Bassler, G., Kriechbaum, M., & Karrer, G. (2015). Pyrrolizidine alkaloid production of *Jacobaea aquatica* under different cutting regimes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(4), 1293-1299.

Chung, S. W. C., & Lam, A. C. H. (2017). Investigation of pyrrolizidine alkaloids including their respective N-oxides in selected food products available in Hong Kong by liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(7), 1184-1192.

De Nijs, M., Mulder, P. P. J., Klijnsma, M. D., Driehuis, F., & Hoogenboom, R. L. A. P. (2017). Fate of pyrrolizidine alkaloids during processing of milk of cows treated with ragwort. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(12), 2212-2219.

Dickinson, J. O. (1980). Release of pyrrolizidine alkaloids into milk. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 23, 377-379.

Dickinson, J. O., Cooke, M. P., King, R. R., & Mohamed, P. A. (1976). Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169(11), 1192-1196.

Edgar, J. A., Colegate, S. M., Boppré, M., & Molyneux, R. J. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 308-324.

EC. (2019). Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (SANTE/12682/2019).

EFSA. (2011). Scientific opinion on pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, 9(11).

EFSA. (2017). Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal*, 15(7), 4908.

FAO, F. a. A. O. (2010). Pyrrolizidine alkaloids in foods and animal feeds. *FAO Consumer Protection Fact Sheets* No. 2, 1-6.

FloraWeb. Version 1.02. Bonn (Deutschland). Bundesamt für Naturschutz [aktualisiert 10.12.2013; Letzter Zugriff: 19.06.2024]. <https://www.floraweb.de/pflanzenarten/pflanzenarten.html>.

Floury, J., Jeanson, S., Aly, S., & Lortal, S. (2010). Determination of the diffusion coefficients of small solutes in cheese: A review. *Dairy Science & Technology*, 90(5), 477-508.

Fu, P. P., Xia, Q., Chou, M. W., & Lin, G. (2007). Detection, hepatotoxicity, and tumorigenicity of pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal plants and herbal dietary supplements. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(4).

Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., & Chou, M. W. (2004). Pyrrolizidine Alkaloids - Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*, 36(1), 1-55.

Gehring, K., Albrecht, H., Kollmann, J., Kuhn, G., Ditton, J., Teixeira, L.H., Linderl, L., Laumer, M., Mayer, F., Wagner, T.C., Gottschalk, C (2021). Effektives Management von Wasser-Kreuzkraut in bayerischem Grünland_Projektabschlussbericht 2021_LfL-Schriftenreihe. *Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft*, ISSN 1611-4159. [https://www.researchgate.net/publication/355537166 Effektives Management von Wasser-Kreuzkraut in bayerischem Grunland Projektabschlussbericht 2021 LfL-Schriftenreihe](https://www.researchgate.net/publication/355537166_Effektives_Management_von_Wasser-Kreuzkraut_in_bayerischem_Grunland_Projektabschlussbericht_2021_LfL-Schriftenreihe)

Gottschalk, C., Huckauf, A., Dübecke, A., Kaltner, F., Zimmermann, M., Rahaus, I., & Beuerle, T. (2018). Uncertainties in the determination of pyrrolizidine alkaloid levels in naturally contaminated honeys and comparison of results obtained by different analytical approaches. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(7), 1366-1383.

Gottschalk, C., Kaltner, F., Zimmermann, M., Korten, R., Morris, O., Schwaiger, K., & Gareis, M. (2020). Spread of *Jacobaea vulgaris* and Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in Regionally Produced Honeys from Northern Germany: Inter- and Intra-Site Variations and Risk Assessment for Special Consumer Groups. *Toxins*, 12(7), 441.

- Gottschalk, C., Ostertag, J., Meyer, K., Gehring, K., Thyssen, S., & Gareis, M. (2018). Influence of grass pellet production on pyrrolizidine alkaloids occurring in *Senecio aquaticus*-infested grassland. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(4), 750-759.
- Gottschalk, C., Ronczka, S., Preiß-Weigert, A., Ostertag, J., Klaffke, H., Schafft, H., & Lahrssen-Wiederholt, M. (2015). Pyrrolizidine alkaloids in natural and experimental grass silages and implications for feed safety. *Animal Feed Science and Technology*, 207, 253-261.
- Griffin, C. (2014). Investigation of Pyrrolizidine Alkaloids in Foods using Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *PhDs* [online].
- Gützkow, K. L., Al Ayoubi, C., Soler Vasco, L., Rohn, S., & Maul, R. (2023). Analysis of ochratoxin A, aflatoxin B1 and its biosynthetic precursors in cheese – Method development and market sample screening. *Food Control*, 143, 109241.
- Hoogenboom, L. A. P., Mulder, P. P. J., Zeilmaker, M. J., van den Top, H. J., Remmelink, G. J., Brandon, E. F. A., Klijstra, M., Meijer, G. A. L., Schothorst, R., & Van Egmond, H. P. (2011). Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 359-372.
- Hooper, P. T. (1978). Pyrrolizidine Alkaloid Poisoning: Pathology with particular reference to differences in animal and plant species. *Academic Press* (Effects of Poisonous Plants on Livestock), 161–176.
- Huybrechts, B., & Callebaut, A. (2015). Pyrrolizidine alkaloids in food and feed on the Belgian market. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(11), 1939-1951.
- Johnson, A. E., Molyneux, R. J., & Ralphs, M. H. (1989). *Senecio* - a poisonous plant for man and beast. *Rangelands*, 11, 261–264.
- Jung, S., Lauter, J., Hartung, N. M., These, A., Hamscher, G., & Wissemann, V. (2020). Genetic and chemical diversity of the toxic herb *Jacobaea vulgaris* Gaertn. (syn. *Senecio jacobaea* L.) in Northern Germany. *Phytochemistry*, 172, 112235.
- Kakar, F., Akbarian, Z., Leslie, T., Mustafa, M. L., Watson, J., Van Egmond, H. P., Omar, M. F., & Mofleh, J. (2010). An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Toxicology*, 2010, 313280.
- Kalač, P., & Kaltner, F. (2021). Pyrrolizidine alkaloids of European *Senecio/Jacobaea* species in forage and their carry-over to milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 280, 115062.
- Kaltner, F., Rychlik, M., Gareis, M., & Gottschalk, C. (2018). Influence of Storage on the Stability of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Peppermint Tea, Hay, and Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(20), 5221-5228.
- Kast, C., Kilchenmann, V., Reinhard, H., Droz, B., Lucchetti, M. A., Dübecke, A., Beckh, G., & Zoller, O. (2018). 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*, 35(2), 316-327.
- Klein, L. M., Gabler, A. M., Rychlik, M., Gottschalk, C., & Kaltner, F. (2022). A sensitive LC–MS/MS method for isomer separation and quantitative determination of 51 pyrrolizidine

alkaloids and two tropane alkaloids in cow's milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(28), 8107-8124.

Klein, L. M., Lamp, J., Schopf, C., Gabler, A. M., Kaltner, F., Guldemann, C., Rychlik, M., Schwake-Anduschus, C., Knappstein, K., & Gottschalk, C. (2024). Pyrrolizidine alkaloids and tropane alkaloids in milk samples from individual dairy farms of the German federal states of Bavaria and Schleswig-Holstein. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-19.

Knoop, K., Klein, L.M., Knispel, A.M., Kaltner, F., Gottschalk, C., Knappstein, K., Saltzmann, J., Dänicke, S. (2024). Dose-response study on the transfer of pyrrolizidine alkaloids from a tansy ragwort extract (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.) to bovine milk. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 41(9), 1144-1157-

Kolrep, F., Numata, J., Kneuer, C., Preiss-Weigert, A., Lahrssen-Wiederholt, M., Schrenk, D., & These, A. (2018). In vitro biotransformation of pyrrolizidine alkaloids in different species. Part I: Microsomal degradation. *Archives of Toxicology*, 92(3), 1089-1097.

Mädge, I., Gehling, M., Schöne, C., & Winterhalter, P. (2020). Pyrrolizidine alkaloid profiling of four Boraginaceae species from Northern Germany and implications for the analytical scope proposed for monitoring of maximum levels. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(8), 1339-1358.

Mattocks, A. R. (1986). Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids: *Academic Press*.

McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., & Everett, D.W. (eds.) (2017). Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology. 4th ed. *Academic Press*, Amsterdam.

Merz, K. H., & Schrenk, D. (2016). Interim Relative Potency Factors for the Toxicological Risk Assessment of Pyrrolizidine Alkaloids in Food and Herbal Medicines. *Toxicology Letters*, 263, 44-57.

Mulder, P. P. J., Klijstra, M. D., Goselink, R. M. A., van Vuuren, A. M., Cone, J. W., Stoop, G., & Hoogenboom, R. L. A. P. (2020). Transfer of pyrrolizidine alkaloids from ragwort, common groundsel and viper's bugloss to milk from dairy cows. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(11), 1906-1921.

Mulder, P. P. J., López Sanchez, P., Castelari, M., Bodi, D., Ronczka, S., Preiß-Weigert, A., & These, A. (2018). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: Results of a survey across Europe. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(1), 118-133.

Mulder, P. P. J., López Sánchez, P., These, A., Preiss-Weigert, A., & Castellari, M. (2015). Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. *EFSA supporting publication*, EN-859.

NTP. (2003). Toxicology and carcinogenesis studies of riddelliine in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *National Toxicology Program Technical Report*. 508.

Petzinger, E. (2011a). Pyrrolizidine alkaloids and seneciosis in farm animals. Part 1: Occurrence, chemistry and toxicology. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere - Nutztiere*, 39(4), 221-230.

Petzinger, E. (2011b). Pyrrolizidine alkaloids and seneciosis in farm animals. Part 2: Clinical signs, species-specific sensitivity, food residues, feed contamination, limit values. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere*, 39(6), 363-372.

Roeder, E. (1992). Pyrrolizidinalkaloidhaltige Arzneipflanzen. 45, 2427-2435.

- Schenk, A., Siewert, B., Toff, S., & Drewe, J. (2015). UPLC TOF MS for sensitive quantification of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids in *Petasites hybridus* extract (Ze 339). *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 997, 23-29.
- Schneider, J., Tsegaye, Y., Tensae, M. W., Selassie, S. G., Haue, T., Bane, A., Ali, A., Mesfin, G., & Seboxa, T. (2012). Veno-occlusive liver disease: A case report. *Ethiopian Medical Journal*, 50(SUPPL. 2), 47-51.
- Smith, L. W., & Culvenor, C. C. J. (1981). Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Natural Products*, 44(2), 129-152.
- Stegelmeier, B. (2004). Pyrrolizidine alkaloids. In: Plumlee KH (Ed.), *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby, St. Louis, Missouri, USA, 370–377
- Stegelmeier, B. L., Edgar, J. A., Colegate, S. M., Gardner, D. R., Schoch, T. K., Coulombe, R. A., & Molyneux, R. J. (1999). Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *Journal of Natural Toxins*, 8(1), 95-116.
- Suttner, G., Weisser, W. W., & Kollmann, J. (2016). Have the distribution and abundance of poisonous herb *Senecio aquaticus* increased in Bavarian grassland? Evaluation of extensive biotope mapping in the periods 1984-1995 and 1999-2013. *Natur und Landschaft*, 91(12), 544–552.
- Taenzer, J., Gehling, M., Klevenhusen, F., Saltzmann, J., Dänicke, S., & These, A. (2022). Rumen Metabolism of Senecio Pyrrolizidine Alkaloids May Explain Why Cattle Tolerate Higher Doses Than Monogastric Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(33), 10111-10120.
- Tamime, A.Y., & Robinson, R.K. (2007). *Yoghurt - Science and Technology*. 3rd ed. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Teuscher, E., & Lindequist, U. (2010). *Biogene Gifte - Biologie-Chemie-Pharmakologie-Toxikologie* (3rd Edition ed.). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Wang, Y.-P., Yan, J., Fu, P. P., & Chou, M. W. (2005). Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. *Toxicology Letters*, 155(3), 411-420.
- Wang, Y. P., Fu, P. P., & Chou, M. W. (2005). Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, retrorsine, leading to DNA adduct formation in vivo. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(1), 74-79.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemond, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K., & Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686.
- Yoon, S. H., Kim, M. S., Kim, S. H., Park, H. M., Pyo, H., Lee, Y. M., Lee, K. T., & Hong, J. (2015). Effective application of freezing lipid precipitation and SCX-SPE for determination of pyrrolizidine alkaloids in high lipid foodstuffs by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 992, 56-66.

10. Übersicht aller bisheriger Veröffentlichungen

10.1. Peer-review Publikationen

Selective and low transfer of pyrrolizidine alkaloids from *Jacobaea vulgaris* Gaertn. into meat and liver of dairy cattle, goat and sheep

Taenzer, J., These, A., Knappstein, K., Lamp, J., Dänicke, S., Saltzmann, J., Gottschalk, C., Fedotenko, I., Jira, W., 2024, *Food control*. 167, 110766. Doi: 10.1016/j.foodcont.2024.110766

Dose-response study on the transfer of pyrrolizidine alkaloids from a tansy ragwort extract (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.) to bovine milk

Knoop, K., Klein, L.M., Knispel, A.M., Kaltner, F., Gottschalk, C., Knappstein, K., Saltzmann, J., Dänicke, S., 2024, *Food Additives & Contaminants: Part A*. 41 (9), 1144-1157, Doi: 10.1080/19440049.2024.2371941

Short-term exposure of dairy cows to pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.): effects on organs and indicators of energy metabolism

Knoop, K., Frahm, J., Kersten, S., Kluess, J., Ulrich Meyer, U., von Soosten, D., Beineke, A., Janine Saltzmann, J., Dänicke, S., 2024, *Archives of Animal Nutrition*, 1–16, Doi: 10.1080/1745039X.2024.2350095

Pyrrolizidine alkaloids and tropane alkaloids in milk samples from individual dairy farms of the German federal states of Bavaria and Schleswig-Holstein.

Klein, L.M., Lamp, J., Schopf, C., Gabler, A.M., Kaltner, F., Guldemann, C., Rychlik, M., Schwake-Anduschus, C., Knappstein, K., Gottschalk, C. 2024, *Food Additives and Contaminants: Part A*. 41 (6), 629-647. Doi: 10.1080/19440049.2024.2336054

Short-term exposure of dairy cows to pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.): effects on health and performance.

Knoop, K., Knappstein, K., Kaltner, F., Gabler, A.M., Tänzner, J., These, A., Kersten, S., Meyer, U., Frahm, J., Kluess, J., Hüther, L., Gottschalk, C., Bach Knudsen, K.E. Saltzmann, J., Dänicke, S., 2023, *Archives of Animal Nutrition*, 77 (5), 363-284. Doi: 10.1080/1745039X.2023.2261806

A sensitive LC–MS/MS method for isomer separation and quantitative determination of 51 pyrrolizidine alkaloids and two tropane alkaloids in cow's milk

Klein, L. M., Gabler, A. M., Rychlik, M., Gottschalk, C., Kaltner, F., 2022, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414 (28), 8107-8124. Doi: 10.1007/s00216-022-04344-5 & 10.1007/s00216-022-04454-0

Rumen metabolism of Senecio Pyrrolizidine Alkaloids May Explain Why Cattle Tolerate Higher Doses Than Monogastric Species

Tänzer, J., Gehling, M., Klevenhusen, F., Saltzmann, J., Dänicke, S., These, A., 2022, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70, 10111-10120. Doi: 10.1021/acs.jafc.2c01332

10.2. Weitere Veröffentlichungen (Printmedien, Tagungsbeiträge etc.)

10.2.1. Tagungsbeiträge (Vorträge, Poster)

2024

Deutsche Lebensmittelchemie Tage

Veränderung von Pyrrolizidinalkaloid- und Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxid-Gehalten bei der Herstellung von Weichkäse Typ Feta aus kontaminierter Schafmilch.

Veränderung von Pyrrolizidinalkaloid- und Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxid-Gehalten bei der Herstellung von Weichkäse Typ Feta aus kontaminierter Schafmilch.

Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz

Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Milch von kleinen Wiederkäuern – Ergebnisse einer Transferstudie

ECVPH AGM & Annual Scientific Conference

Studies on the contamination and fate of pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in milk and dairy products (yogurt, cheese)

2023

Deutsche Lebensmittelchemie Tage

Stabilität von Pyrrolizidinalkaloiden und Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxiden bei der Herstellung von Rührjoghurt aus Ziegenmilch.

Nachweis von Pyrrolizidinalkaloiden in Kuhmilch von Erzeugerbetrieben aus Bayern und Schleswig-Holstein

Forschungskolloquium - Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Quantifizierung von Pyrrolizidinalkaloiden in Kuhmilch mittels LC-MS/MS

Gesellschaft für Ernährungsphysiologie-Tagung

Carry-over of pyrrolizidine alkaloids (PAs) into milk in a chronic PA exposure scenario of dairy cows.

Universität Halle Studierenden-Exkursion

Chronic exposure of dairy cows to pyrrolizidine alkaloids: Effects on health and performance.

Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten Kongress

Auswirkungen auf Leistungs- und Gesundheitsparameter bei Pyrrolizidinalkaloid-exponierten Milchkühen.

2022

Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz

A sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantitative determination of 51 pyrrolizidine alkaloids and two tropane alkaloids in cows' milk

BMEL-Workshop „Futter und Fütterung der Zukunft“

Untersuchungen zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden bei Kühen, Schafen und Ziegen (PA-SAFE-FEED Verbundprojekt)

Deutscher Lebensmittelchemiker Tag

Stabilität von Pyrrolizidinalkaloiden und Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxiden bei der Herstellung von Rührjoghurt

Untersuchungen zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden bei Kühen, Schafen und Ziegen (PA-SAFE-FEED Verbundprojekt)

Gesellschaft für Ernährungsphysiologie-Tagung

Chronic exposure of dairy cows to pyrrolizidine alkaloids: Effects on health and performance

International Mass Spectrometry Conference Maastricht

A sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantitative determination of 54 pyrrolizidine alkaloids and two tropane alkaloids in cows' milk

Junior Scientist Symposium (FLI)

Hepatic effects of pyrrolizidine alkaloids in a chronic scenario of dairy cows

Regionalverbandstagung Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft

Nachweis von Pyrrolizidinalkaloiden und Tropanalkaloiden mittels LC-MS/MS

Sitzung der Arbeitsgruppe “Carry-over unerwünschter Stoffe in Futtermitteln“

Toxikokinetik von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) – Ergebnisse aus dem Hauptversuch

Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in die Kuhmilch

Vet Med Summer School Zürich

Studies on the transfer of pyrrolizidine alkaloids in cows, ewes and goats

2021

Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz

Untersuchungen zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Kuhmilch - erste Ergebnisse des Monitorings von Milchproben aus Bayern und Schleswig-Holstein im Rahmen des Verbundforschungsprojekt PA-SAFE-FEED.

Deutscher Lebensmittelchemiker Tag

Untersuchungen zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden bei Kühen, Schafen und Ziegen (PA-SAFE-FEED Verbundprojekt)

Junior Scientist Symposium (FLI)

The relationship of pyrrolizidine alkaloids to performance parameters and hepatic effects of dairy cows

Leipziger Doktorandenforum

Toxic effects of pyrrolizidine alkaloids on dairy cows

2020

Sitzung der Arbeitsgruppe “Carry-over unerwünschter Stoffe in Futtermitteln“

Hauptversuch zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Milchkühen

10.2.2. Printmedien

2023

Klein, L. M., Gabler, A. M., Rychlik, M., Gottschalk, C., & Kaltner, F. Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden und Tropanalkaloiden in Kuhmilch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 119(2), 67-68.

Klein, L. M., Nöbel, S., Schrader, K., Knappstein, K., Lamp, J., Balázs, B., Rychlik, M., Guldemann, C., Gottschalk, C., Kaltner, F., & Gabler, A. M.. Stabilität von Pyrrolizidinalkaloiden und Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxiden bei der Herstellung von Rührjoghurt aus Ziegenmilch. *Lebensmittelchemie*, 77(S3), 219. Doi: 10.1002/lemi.202359190

Klein, L. M., Lamp, J., Schopf, C., Gabler, A. M., Guldemann, C., Rychlik, M., Kaltner, F., Knappstein, K., Gottschalk, C. Nachweis von Pyrrolizidinalkaloiden in Kuhmilch von Erzeugerbetrieben aus Bayern und Schleswig-Holstein. *Lebensmittelchemie*, 77(S3), 223. Doi: 10.1002/lemi.202359194

Knoop, K., Knappstein, Gabler, A. M, Klein, L., Gottschalk, C., Taenzer, J., These, A., Kaltner, F., Meyer, U., Saltzmann, J., Dänicke, S. Carry-over of pyrrolizidine alkaloids (PAs) into milk in a chronic PA exposure scenario of dairy cows. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 32, 113.

2022

Gabler, A.M., Klein, L., Knappstein, K., Lamp, J., Nöbel, S., Schrader, K., Jira, W., Fedotenko, I., Dänicke, S., Saltzmann, J., Knoop, K., Gehling, M., These, A., Tänzner, J., Gottschalk, C. Untersuchungen zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden bei Kühen, Schafen und Ziegen (PA-SAFE-FEED Verbundprojekt). *Lebensmittelchemie*, 76 (S2), 291 Doi: 10.1002/lemi.202259237

Klein, L., Gabler, A., Rychlik, M., Gottschalk, C., & Kaltner, F. (2022). Nachweis von Pyrrolizidinalkaloiden und Tropanalkaloiden mittels LC-MS/MS. *Lebensmittelchemie*, 76(S1), 079. Doi: 10.1002/lemi.202254005

Klein, L. M., Nöbel, S., Schrader, K., Baumann, E., Gabler, A. M., Rychlik, M., Gottschalk, C., Kaltner, F. (2022). Stabilität von Pyrrolizidinalkaloiden und Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxiden bei der Herstellung von Rührjoghurt. *Lebensmittelchemie*, 76(S2), 298.

Klein, L., Gabler, A., Rychlik, M., Gottschalk, C., & Kaltner, F. (2022). A sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantitative determination of 51 pyrrolizidine alkaloids and two tropane alkaloids in cows' milk. In G. Deutsche Veterinärmedizinische (Ed.), 62. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (1. Auflage ed.). Gießen: *Verlag der DVG Service GmbH*. ISBN: 978-3-86345-629-0

Klein, L., Gabler, A., Rychlik, M., Gottschalk, C., & Kaltner, F. (2022). A sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantitative determination of 54 pyrrolizidine alkaloids and two tropane alkaloids in cows' milk. In International Mass Spectrometry Conference 2022 (pp. 93). Maastricht: *International Mass Spectrometry Foundation*.

Knoop, K., Knappstein, K., Kaltner, F., Taenzer, J., Kersten, S., Meyer, U., Frahm, J., Kluess, J., Gottschalk, C., Saltzmann, J., Dänicke, S. Chronic exposure of dairy cows to pyrrolizidine alkaloids: Effects on health and performance. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 32, 69.

2021

Klein, L., Schopf, C., Lamp, J., Kaltner, F., Knappstein, K., Gabler, A., Guldemann, C., Gareis, M., & Gottschalk, C. (2021). Untersuchungen zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Kuhmilch - erste Ergebnisse des Monitorings von Milchproben aus Bayern und Schleswig-Holstein im Rahmen des Verbundforschungsprojekt PA-SAFE-FEED. In G. Deutsche Veterinärmedizinische (Ed.), 61. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (1. Auflage ed.). Gießen: *Verlag der DVG Service GmbH*. ISBN: 978-3-86345-584-2