

# **Entwicklung flüssigkeitschromatographisch- massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl von Ossietzky  
Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades und Titels eines Doktors der Natur-  
wissenschaften (Dr. rer. nat.) angenommene Dissertation

von Herrn Christoph Portner  
geboren am 08.03.1975 in Duisburg

Gutachter: apl. Prof. Dr. Werner Butte  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Gunther Wittstock  
Tag der Disputation: 06.02.2012

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	1
2	Grundlagen .....	4
2.1	HAUSSTAUB .....	4
2.2	SCHIMMELPILZE .....	7
2.3	MYKOTOXINE .....	9
2.4	KOPPLUNG VON FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE UND MASSENSPEKTROMETRIE .....	12
2.4.1	<i>Flüssigkeitschromatographie</i> .....	13
2.4.2	<i>Massenspektrometrie</i> .....	14
3	Material und Methoden .....	21
3.1	CHEMIKALIEN UND GERÄTE .....	21
3.2	AUSGEWÄHLTE MYKOTOXINE .....	21
3.3	HAUSSTAUBPROBEN .....	31
3.3.1	<i>Herkunft der Proben</i> .....	31
3.3.2	<i>Probennahme</i> .....	32
3.3.3	<i>Fragebogen</i> .....	33
3.3.4	<i>Extraktion</i> .....	34
3.3.5	<i>Bestimmung des Wasser- und Glühverlustes</i> .....	34
3.4	ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG VON METHODEN ZUM NACHWEIS VON MYKOTOXINEN BEIM FEHLEN VON REFERENZSUBSTANZEN AM BEISPIEL VON STACHYBOTRYS CHARTARUM .....	36
3.4.1	<i>Kultivierung</i> .....	36
3.4.2	<i>Extraktion</i> .....	37
3.5	LC-MS MESSMETHODEN .....	39
3.5.1	<i>Quantifizierung mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie</i> .....	39
3.5.2	<i>Quantifizierung mittels HPLC-Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie</i> .....	44
3.5.3	<i>Screening mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie</i> .....	44
3.5.4	<i>Screening mittels Kapillar-HPLC-Flugzeitmassenspektrometrie</i> .....	46
3.5.5	<i>Screening mittels HPLC-Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie</i> .....	47
4	Ergebnisse .....	48
4.1	OPTIMIERUNG DER LC-MS MESSMETHODEN .....	48
4.1.1	<i>Auswahl der spezifischen MRM-Übergänge</i> .....	48
4.1.2	<i>Selektivität/ Spezifität</i> .....	50
4.1.3	<i>Matrixeffekte</i> .....	53
4.1.4	<i>Vergleich verschiedener organischer Lösemittel</i> .....	55
4.2	QUANTITATIVER NACHWEIS VON MYKOTOXINEN .....	57
4.2.1	<i>Methode zur Quantifizierung mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie</i> .....	57
4.2.2	<i>Methode zur Quantifizierung mittels HPLC-Quadrupolflugzeitmassen-spektrometrie</i> .....	59
4.2.3	<i>Nachweis in Innenraummaterialien</i> .....	60
4.2.4	<i>Auswertung der Fragebögen der selbst gesammelten Hausstaubproben</i> .....	64
4.2.5	<i>Bestimmung des Wasser- und Glühverlust der selbst gesammelten Hausstaubproben</i> .....	67
4.3	QUALITATIVER NACHWEIS VON MYKOTOXINEN BEIM FEHLEN VON REFERENZSUBSTANZEN AM BEISPIEL VON STACHYBOTRYS CHARTARUM .....	69
4.3.1	<i>Identifizierung von Mykotoxinen mittels Hybridmassenspektrometrie</i> .....	69
4.3.2	<i>Identifizierung von Mykotoxinen mittels Flugzeitmassenspektrometrie</i> .....	74
4.3.3	<i>Unterscheidung der Chemotypen von Stachybotrys chartarum</i> .....	77
4.4	PRODUKTIONSVERLAUF DER TOXINE VON STACHYBORTYS CHARTARUM .....	82
5	Diskussion .....	90
5.1	METHODENENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG .....	90
5.1.1	<i>Auswahl der spezifischen MRM-Übergänge</i> .....	90
5.1.2	<i>Selektivität/Spezifität</i> .....	91
5.1.3	<i>Matrixeffekte</i> .....	92
5.1.4	<i>Vergleich verschiedener organischer Lösemittel</i> .....	93

5.1.5	<i>Schlussfolgerungen zur Methodenentwicklung und Optimierung</i> .....	94
5.2	QUANTITATIVER NACHWEIS VON MYKOTOXINEN .....	97
5.2.1	<i>Methoden zur Quantifizierung von Mykotoxinen</i> .....	97
5.2.2	<i>Nachweis in Innenraummaterialien</i> .....	99
5.2.3	<i>Auswertung der Fragebögen zu den selbst gesammelten Schadensfall- und Kontrollproben</i> .....	101
5.2.4	<i>Schlussfolgerungen zum quantitativen Nachweis von Mykotoxinen</i> .....	102
5.3	QUALITATIVER NACHWEIS VON MYKOTOXINEN BEIM FEHLEN VON REFERENZSUBSTANZEN AM BEISPIEL VON STACHYBOTRYS CHARTARUM .....	105
5.3.1	<i>Identifizierung von Mykotoxinen mittels Hybridmassenspektrometrie</i> .....	105
5.3.2	<i>Identifizierung von Mykotoxinen mittels Flugzeitmassenspektrometrie</i> .....	106
5.3.3	<i>Unterscheidung der Chemotypen von Stachybotrys chartarum anhand der Mykotoxinprofile</i> .....	106
5.3.4	<i>Schlussfolgerungen zum qualitativen Nachweis von Mykotoxinen beim Fehlen von Referenzsubstanzen am Beispiel von Stachybotrys chartarum</i> .....	107
5.4	PRODUKTIONSVERLAUF DER TOXINE VON STACHYBOTRYS CHARTARUM.....	109
5.4.1	<i>Satratoxin G</i> .....	109
5.4.2	<i>Satratoxin H</i> .....	110
5.4.3	<i>Trichoverrin A und B</i> .....	110
5.4.4	<i>Schlussfolgerungen zum Produktionsverlauf der Toxine von Stachybotrys chartarum</i> .....	111
6	Zusammenfassung.....	114
7	Summary.....	117
8	Literaturverzeichnis .....	120
9	Anhang.....	131
	Erklärung.....	140
	Danksagung.....	141
	Lebenslauf .....	142

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahme von typischen Inhaltsstoffen der Hausstaubfraktion $\leq 63 \mu\text{m}$ .....	4
Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Pollenkorns, eines Faserendes und von Hautschuppen in der Hausstaubfraktion $\leq 63 \mu\text{m}$ .....	5
Abbildung 3: Übersicht zwischen der Polarität der Analyten, der Molekülmasse und den möglichen Messtechniken .....	12
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems. ....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Messdatenaufnahme mittels LC-MS. Das Chromatogramm stellt den zeitlichen Verlauf der detektierten Massenspektren dar. ....	16
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Triplequadropolmassenspektrometers mit linearer Ionenfalle.....	18
Abbildung 7: Schematischer Ablauf von informationsabhängigen Experimenten (IDA) im MS bei einer Messung. Das dominante Vorläuferion wird im Suchlauf selektiert und im abhängigen Experiment gezielt fragmentiert. ....	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Quadrupolflugzeitmassenspektrometers (QTOF).....	20
Abbildung 9: Strukturformel von Aflatoxin B <sub>1</sub> .....	21
Abbildung 10: Strukturformel von Citrinin .....	22
Abbildung 11: Strukturformel von Deoxynivalenol.....	23
Abbildung 12: Strukturformel von Diacetoxyscirpenol.....	24
Abbildung 13: Strukturformel von Gliotoxin .....	24
Abbildung 14: Strukturformel von Ochratoxin A .....	25
Abbildung 15: Strukturformel von Roridin A .....	26
Abbildung 16: Strukturformel von Roridin L-2 .....	27
Abbildung 17: Strukturformel von Satratoxin G .....	28
Abbildung 18: Strukturformel von Satratoxin H .....	29
Abbildung 19: Strukturformel von Sterigmatocystin .....	30
Abbildung 20: Jeder weiße Punkt in der Übersichtskarte (Schwimmer 2011) markiert einen Postleitzahlenbezirk in der Bundesrepublik Deutschland aus dem eine oder auch mehrere Proben stammen. Jeweils eine weitere Probe stammt aus Belgien, Österreich und Spanien. ....	32
Abbildung 21: Ansicht typischer Inhaltsstoffe im Staubsaugerbeutel und in gesiebten Hausstaubfraktionen .....	33
Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahme von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 (links) und Literaturvergleich (rechts, Samson et al. 2002).....	37
Abbildung 23: Anteil des organischen Eluenten (B) bei positiver Ionisierung .....	40
Abbildung 24 Anteil des organischen Eluenten (B) bei negativer Ionisierung.....	41
Abbildung 25: MRM-Chromatogramm für eine Standardlösung von Deoxynivalenol mit 100 ng/mL .....	49
Abbildung 26:MRM-Chromatogramm für eine Standardlösung von Deoxynivalenol mit 100 ng/mL für die optimierte Messmethode .....	50
Abbildung 27: Totalionenchromatogramm der sechs im ESI-positiv Modus ionisierbaren Mykotoxine eines mit jeweils 40 ng/mL dotierten Poolstaubprobeextraktes .....	51
Abbildung 28: Extrahiertes EMS-Chromatogramm für Massenspur des protonierten Vorläuferions von Aflatoxin B <sub>1</sub> (313 <i>m/z</i> ) in einem mit 40 ng/mL dotierten Poolstaubprobeextrakt, Retentionszeit des Referenzstandards 4,47 Minuten.....	52

Abbildung 29: MRM-Chromatogramm für die extrahierten Massenübergänge von Aflatoxin B1 in einem mit 40 ng/mL dotierten Poolstaubprobeextrakt, Retentionszeit des Referenzstandards 4,47 Minuten .....	53
Abbildung 30: MRM-Chromatogramm für die einzelnen Massenspuren der sechs Mykotoxine die sich im positiven Elektrospraymodus ionisieren ließen. Der Poolstaubprobenextrakt wurde über die Trennsäule chromatographiert. Eine Referenzstandardlösung mit 1 µg/mL wurde nach der Trennsäule über ein T-Stück im Verhältnis 1:100 in den Lösemittelfluss aus der HPLC-Anlage gegeben.....	54
Abbildung 31: Vergleich von Intensitäten und Elutionsreihenfolge von acht Mykotoxinen bei verschiedenen organischen Co-Solventien, (Gradienten des Co-Eluenten von 5% auf 100% ansteigend) .....	56
Abbildung 32: Ansicht einer mit Schimmelpilzen befallenen Tapete auf einer Außenwand .....	64
Abbildung 33: Relative Häufigkeitsverteilung des Wasserverlustes der untersuchten Schadensfall- und Kontrollproben (n = 354).....	67
Abbildung 34: Relative Häufigkeitsverteilung des Glühverlustes der untersuchten Schadensfall- und Kontrollproben (n = 354).....	68
Abbildung 35: Totalionenchromatogramm einer mit Chloroform und Methanol im Verhältnis 1:1 extrahierten Probe vom <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 .....	69
Abbildung 36: Chromatogramm der extrahierten Massenspur 529 m/z des Extraktes von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 mit zwei charakteristischen Peaks zur Retentionszeit von 14,09 und 15,23 min. ....	70
Abbildung 37: Totalionenspektrum zur Retentionszeit 14,09 min der Masse 529 m/z eines Extraktes von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 .....	71
Abbildung 38: Produktionenspektrum vom Vorläuferion 529 m/z eines Extraktes von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1.....	72
Abbildung 39: MRM-Chromatogramm von Satratoxin G und H einer extrahierten Probe von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 .....	73
Abbildung 40: Cap-LC-TOF-MS Chromatogramm der extrahierten Massenspuren von Satratoxin G und H, sowie den jeweiligen Isomeren einer extrahierten Probe von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1.....	74
Abbildung 41: HPLC-QTOF-MS Chromatogramm der extrahierten Massenspuren von Satratoxin G und H sowie den jeweiligen Isomeren einer extrahierten Probe von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1.....	75
Abbildung 42: Produktionenspektrum von Satratoxin H bei 4,7 min. einer extrahierten Probe von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 .....	76
Abbildung 43: Produktionenspektrum von Satratoxin G bei 4,4 min. einer extrahierten Probe von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 .....	76
Abbildung 44: Chromatogramm der extrahierten Massenspuren für die identifizierten Mykotoxine in der Probe vom <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 .....	77
Abbildung 45: Chromatogramm der extrahierten Massenspuren für die identifizierten Mykotoxine in der Probe vom <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S2 .....	78
Abbildung 46: Chromatogramm der extrahierten Massenspuren für die identifizierten Mykotoxine in der Probe vom <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S3 .....	78
Abbildung 47: Chromatogramm der extrahierten Massenspuren für die identifizierten Mykotoxine in der Probe vom <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S4 .....	79
Abbildung 48: Wachstumsverlauf von <i>Stachybotrys chartarum</i> Stamm S1 auf den eingesetzten Nährmedien Kartoffelpüree (KP) und Instantreisflocken (IRF) .....	83
Abbildung 49: Produktionsverlauf von Satratoxin G für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme auf Instantreisflocken bei Raumtemperatur .....	83

Abbildung 50: Produktionsverlauf von Satratoxin G für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme auf Kartoffelpüree bei Raumtemperatur .....	84
Abbildung 51: Produktionsverlauf von Satratoxin G für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme auf Instantreisflocken bei RT, nach 3. Woche bei 4°C .....	84
Abbildung 52: Produktionsverlauf für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme von Satratoxin G auf Kartoffelpüree bei RT, nach 3. Woche bei 4°C.....	85
Abbildung 53: Produktionsverlauf von Satratoxin H für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme auf Instantreisflocken bei Raumtemperatur .....	86
Abbildung 54: Produktionsverlauf von Satratoxin H für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme auf Kartoffelpüree bei Raumtemperatur .....	86
Abbildung 55: Produktionsverlauf von Satratoxin H für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme auf Instantreisflocken bei RT, nach 3. Woche bei 4°C .....	87
Abbildung 56: Produktionsverlauf für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme von Satratoxin H auf Kartoffelpüree bei RT, nach 3. Woche bei 4°C.....	87
Abbildung 57: Vergleich der Probenvorbereitungsmethoden mit und ohne Festphasenanreicherung am Beispiel von Satratoxin G .....	89
Abbildung 58: Vergleich der Probenvorbereitungsmethoden mit und ohne Festphasenanreicherung am Beispiel von Satratoxin H .....	89

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Einteilung der Schimmelpilze im Innenraum anhand der Wasseraktivität.....	8
Tabelle 2: Auswahl von im Innenraum und in Baumaterialien beschriebenen Mykotoxinen .....	10
Tabelle 3: Übersicht über verschiedene Messmodi eines Hybridmassenspektrometers .....	19
Tabelle 4: Bezeichnungen und Eigenschaften des Aflatoxin B <sub>1</sub> .....	22
Tabelle 5: Bezeichnungen und Eigenschaften des Citrinin .....	22
Tabelle 6: Bezeichnungen und Eigenschaften des Deoxynivalenol.....	23
Tabelle 7: Bezeichnungen und Eigenschaften des Diacetoxyscirpenol .....	24
Tabelle 8: Bezeichnungen und Eigenschaften des Gliotoxin .....	25
Tabelle 9: Bezeichnungen und Eigenschaften des Ochratoxin A .....	25
Tabelle 10: Bezeichnungen und Eigenschaften von Roridin A .....	26
Tabelle 11: Bezeichnungen und Eigenschaften von Roridin L-2.....	27
Tabelle 12: Bezeichnungen und Eigenschaften des Satratoxin G .....	28
Tabelle 13: Bezeichnungen und Eigenschaften des Satratoxin H .....	29
Tabelle 14: Bezeichnungen und Eigenschaften des Sterigmatocystin.....	30
Tabelle 15: Chromatographische Parameter der Mykotoxinmultimethode .....	40
Tabelle 16: Optimierte MS-Parameter bei positiver und negativer Ionisierung .....	41
Tabelle 17: Optimierte MS-Parameter zur Quantifizierung (Fett) und zur Qualifizierung bei positiver Ionisierung.....	42
Tabelle 18: Optimierte MS-Parameter zur Quantifizierung (Fett) und Qualifizierung bei negativer Ionisierung .....	43
Tabelle 19: Optimierte chromatographische Parameter.....	44
Tabelle 20: Optimierte MS-Parameter.....	44
Tabelle 21: Optimierte chromatographische Parameter für die HPLC-MS-Screeningmethode .....	45
Tabelle 22: Optimierte MS-Parameter.....	45
Tabelle 23: Optimierte chromatographische Parameter für die Screeningmethode.....	46
Tabelle 24: Optimierte MS-Parameter.....	46
Tabelle 25: Optimierte chromatographische Parameter.....	47
Tabelle 26: Optimierte MS-Parameter.....	47
Tabelle 27: Analytische Kenndaten der acht Mykotoxine für die Quantifizierungsmethode mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie, Instrumentelle Nachweisgrenze bezogen auf die Konzentration des kleinsten Standards mit S/N ≥ 3, (Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen berechnet nach DIN 32645) .....	57
Tabelle 28: Wiederfindungsraten der acht Mykotoxine für die Quantifizierungsmethode mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie bestimmt an zwei Tagen. ....	59
Tabelle 29: Nachweisgrenze und Retentionszeit der acht Mykotoxine für die Quantifizierungsmethode mittels HPLC-Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie, Instrumentelle Nachweisgrenze bezogen auf die Konzentration des kleinsten Standards mit S/N ≥ 3 .....	60
Tabelle 30: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 854 untersuchten Hausstaubproben; (Staubfraktion ≤ 63 µm).....	61
Tabelle 31: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 500 untersuchten Kontrollproben aus der NLL-Studie (Hoffmann et al. 2008); (Staubfraktion ≤ 63 µm).....	62



Tabelle 32: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 153 selbst gesammelten Schadensfallproben; (Staubfraktion $\leq 63 \mu\text{m}$ ) .....	62
Tabelle 33: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 201 selbst gesammelten Kontrollproben; (Staubfraktion $\leq 63 \mu\text{m}$ ) .....	63
Tabelle 34: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 18 untersuchten Baustoffproben .....	64
Tabelle 35: Vergleich der Gehalte an Sterigmatocystin und von <i>Aspergillus versicolor</i> in den selbst gesammelten Hausstaubproben, in denen Sterigmatocystin nachgewiesen werden konnte.....	65
Tabelle 36: Vergleich der Gehalte an Deoxynivalenol und kultivierbaren <i>Fusarien spp.</i> in den selbst gesammelten Hausstaubproben, in denen Deoxynivalenol nachgewiesen werden konnte.....	65
Tabelle 37: Verteilung des Wasser- und Glühverlustes aller untersuchten Schadensfall- und Kontrollproben (n = 354) .....	68
Tabelle 38: MS-Parameter für die identifizierten Mykotoxine von <i>Stachybotrys chartarum</i> .....	73
Tabelle 39: Vergleich der mit der Cap-LC-TOF-MS und der HPLC-QTOF-MS in Stamm S1 nachgewiesenen Mykotoxine.....	80
Tabelle 40: Vergleich der mit der Cap-LC-TOF-MS und der HPLC-QTOF-MS in Stamm S3 nachgewiesenen Mykotoxine.....	81
Tabelle 41: Maximale Gehalte von Satratoxin G für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme in ng (Mykotoxin) / g (Einwaage Feuchtgewicht) während der Inkubation auf IRF- und KP-Medium bei Raumtemperatur, nach 3. Woche bei 4°C .....	85
Tabelle 42: Maximale Gehalte von Satratoxin H für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme in ng (Mykotoxin) / g (Einwaage Feuchtgewicht) während der Inkubation auf IRF- und KP-Medium bei Raumtemperatur, nach 3. Woche bei 4°C .....	87
Tabelle 43: Maximale Gehalte von Trichoverrin A und B für die untersuchten <i>Stachybotrys chartarum</i> Stämme in ng (Mykotoxin) / g (Einwaage Feuchtgewicht) während der Inkubation auf IRF- und KP-Medium bei Raumtemperatur, nach 3. Woche bei 4°C.....	88
Tabelle 44: Wiederfindungsraten von Roridin A für die beiden Nährmedien .....	88
Tabelle 45: Liste der verwendeten Chemikalien .....	131
Tabelle 46: Liste der verwendeten Geräte .....	131
Tabelle 47: Analytische Kenndaten der Methode zur Quantifizierung von acht Mykotoxinen im Hausstaub mittels HPLC-Hybridmassenspektrometer .....	132
Tabelle 48: Wiederfindungsraten für die Quantifizierung von acht Mykotoxinen im Hausstaub mittels HPLC-MS/MS berechnet nach Matuszewski et al. (2003); Messtag 1 ...	132
Tabelle 49: Wiederfindungsraten für die Quantifizierung von acht Mykotoxinen im Hausstaub mittels HPLC-MS/MS berechnet nach Matuszewski et al. (2003), Messtag 2 ...	134
Tabelle 50: Fragebogen .....	136

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Prozentualer Anteil des wässrigen Lösungsmittels
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck)
$a_w$	Wasseraktivität = Quotient des Wasserdampfdrucks über einem Substrat zu dem Wasserdampfdruck über reinem Wasser bei derselben Temperatur
B	Prozentualer Anteil des organischen Lösungsmittels
$c_A$	Konzentration des Analyten in der Standardlösung
$c_B$	Konzentration des Analyten in der vor der Messung dotierten Probe
$c_C$	Konzentration des Analyten in der vor der Extraktion dotierten Probe
CAS	Chemical Abstracts Service (Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe)
Cap-LC	Capillary liquid chromatography (Kapillarflüssigkeitschromatographie)
CE	Collision energy (Kollisionsenergie)
CEP	Collision cell entrance potential (Kollisionszelleneingangspotential)
cps	counts per second (Maßeinheit für die Signalintensität)
CXP	Collision cell exit potential (Kollisionszellenausgangspotential)
Da	Dalton (Maßeinheit für die Molekülmasse in der Massenspektrometrie)
DC	Dünnschichtchromatographie
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DG18	Dichloran-Glycerin-Agar (Nährmedium)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DP	Declustering potential (Entclusterungspotential)
EMS	Enhanced MS (Erweiterter Suchlaufmessmodus in der Massenspektrometrie)
EP	Entrance potential (Eingangspotential)
EPI	Enhanced product ion spectra (Erweitertes Produktionenspektrum)
ESI	Elektrosprayionisierung
FCPC	Fast Centrifugal Partition Chromatography (Schnelle Zentrifugalverteilungschromatographie)
FLD	Fluoreszenzdetektor
GC	Gaschromatographie

HPLC	High Performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPTLC	High Performance thin layer chromatography (Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
IDA	Information Dependent Acquisition (Informationsabhängige Messung)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IUTA	Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.
IRF	Instanttreisflocken (Nährmedium)
KBE	Anzahl der koloniebildenden Einheiten
KP	Kartoffelpüree (Nährmedium)
LC	Liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
LIT	Linear Ion Trap (Lineare Ionenfalle)
log $K_{OW}$	dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
$m_a$	Masse der leeren Schale
$m_b$	Masse der Schale mit der Trockenmasse
$m_c$	Masse der Schale mit Glührückstand
$m_d$	Masse der Schale mit frischem Staub
$m_G$	Masse Glührückstand
$m_T$	Masse Trockenmasse
$m_{WV}$	Masse Wasserverlust
ME	Matrixwiederfindung
MEA	Malzextraktagar (Nährmedium)
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring (Messmodus in der Massenspektrometrie)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
$m/z$	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	Anzahl
NLL	Norddeutsche Leukämie- und Lymphomstudie
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanzspektroskopie)
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCP	Pentachlorphenol
PE	Prozesswiederfindung
PEI	Polyethylenimid-Festphase
PI	Produktionenspektrum

pK <sub>s</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
ppm	parts per million (Verhältnisangabe)
psi	pounds per square inch (Maßeinheit für Druck)
Q	Quadrupol
Q1	Quadrupol 1
q2	Quadrupol 2 (Kollisionszelle)
Q3	Quadrupol 3
QqQ	Tripelquadrupolmassenspektrometer
QTOF	Quadrupolflugzeitmassenspektrometer
RE	Extraktionswiederfindung
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
SRM	Selected-Reaction-Monitoring (Messmodus in der Massenspektrometrie)
SPE	Solid phase extraction (Festphasenextraktion)
spp.	<i>species pluralis</i> $\triangleq$ mehrere Spezies dieser Gattung
S/N	Signal-to-noise-ratio (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
TDI	tolerable daily intake (Tolerierbare tägliche Aufnahme)
TLC	Thin layer chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TOF	Time of flight mass spectrometer (Flugzeitmassenspektrometer)
u	Atomare Masseneinheit
UV	ultraviolettes Licht
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
WV	Wasserverlust
z	Anzahl der elementaren Ladungen
$\beta$	Massenkonzentration
$\beta_{GG}$	Glührückstand
$\beta_{Gv}$	Glühverlust

## 1 Einleitung

Die gesundheitschädliche Wirkung von Schimmelpilzen in Innenräumen ist schon seit dem Altertum bekannt. So findet sich im Alten Testament im 3. Buch Mose (Leviticus), Kapitel 14, Vers 33-53 eine Beschreibung zur Diagnose, Sanierung und anschließender Kontrolluntersuchung. Diese drei einzelnen Schritte werden auch im Schimmelpilzleitfaden des Umweltbundesamtes aufgeführt (Moriske und Szewzyk 2002).

Auch die schädliche Wirkung von verschimmelten Lebens- und Futtermitteln ist seit langem bekannt. Bereits im Mittelalter wurden die Wirkung und Ursache des Ergotismus, der auch als St. Antoniusfeuer bezeichneten Erkrankung, durch die Mutterkornbildung des Schimmelpilzes *Claviceps purpurea* auf Getreideähren belegt (Reiß 1976, Bennett und Klich 2003). Der Begriff Schimmelpilzgift bzw. Mykotoxin wurde in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts eingeführt, nach dem die Kausalität zwischen dem Versterben von 100000 jungen Puten in England durch den Verzehr von mit *Aspergillus flavus* kontaminiertem Erdnussmehl aus Brasilien geklärt worden war. Diese als „Turkey X“ bezeichnete Krankheit war der Startpunkt der modernen Mykotoxinforschung und wurde durch Aflatoxine im Futter hervorgerufen (Sargeant et al. 1961, Gareis 1999). Seitdem wurden die Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen von Schimmelpilzen und der Bildung von Mykotoxinen intensiv erforscht. Hieraus resultieren auch Richt- und Grenzwerte u. a. von der Europäischen Kommission für bestimmte Toxine in Lebens- und Futtermitteln. Die Produktion von Mykotoxinen ist abhängig von biotischen und abiotischen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Wasseraktivität und Nährstoffangebot (Nielsen 2002). Ein üppiges Schimmelpilzwachstum bedeutet nicht eine hohe Toxinproduktion und umgekehrt (Nielsen 2002). Über 400 dieser sekundären Metabolite sind bisher bekannt (Nielsen und Smedsgaard 2003). Nur ein geringer Teil der in der Literatur beschriebenen Substanzen ist aber als Reinstoff erhältlich (Islam et al. 2009).

Über das Vorkommen und die Verteilung von Mykotoxinen in Innenräumen ist bisher weit weniger bekannt als für den Bereich der Nahrungs- und Futtermittel. Generell sind Innenraumschadstoffe von gesundheitlicher Relevanz, da sich Menschen in Industrieländern täglich zu über 65 % ihrer Zeit in ihren Wohnräumen aufhalten (Brasche und Bischof 2005). Durchschnittlich halten sie sich zu 80-90 % in geschlosse-

nen Räumen auf (Sagunski 1995, Friedrich et al. 2001, Meikel et al. 2007a). Bei der Untersuchung von 5530 Haushalten in Deutschland durch geschulte Interviewer wurden in 21,9 % der Fälle ein sichtbarer Feuchtigkeitsschaden und in 9,3 % ein sichtbarer Schimmelpilzbefall festgestellt (Brasche et al. 2003). Ein verstärktes Auftreten von Feuchtigkeitsschäden in Innenräumen ist nach nicht korrekt ausgeführten Maßnahmen zur Energieeinsparung bei der Altbausanierung z.B. durch den Einbau neuer Fenster ohne entsprechende Wanddämmung zu beobachten (Hutter et al. 2005, Clausnitzer 2006a, 2006b). Aber auch bei Neubauten kommt es zu Schäden durch Schimmelpilzbefall aufgrund nicht fachgerechter Erstellung oder zu kurzer Trocknungszeiten des Bauwerks (Frössel 2006, Hankammer und Lorenz 2007). Neben baulich-technischen Ursachen kann ein Schimmelpilzbefall auch durch das Nutzungsverhalten der Bewohner hervorgerufen werden (Frössel 2006, Hankammer und Lorenz 2007).

In artifiziellen und fallinduzierten Baumaterialien sowie auch in Hausstaub konnten verschiedene Mykotoxine nachgewiesen werden (Nielsen et al. 1998, Jarvis und Miller 2005, Bloom et al. 2009). Die bisherigen Arbeiten unterscheiden sich allerdings deutlich in den eingesetzten Probenahmeverfahren, den untersuchten Probenmatri- ces und den angewandten analytischen Nachweismethoden. Häufig wurden nur einzelne Substanzen analysiert oder die Messmethoden an sehr wenigen Proben angewandt. Engelhart et al. (2002) berichten über das Vorkommen vom Schimmelpilz *Aspergillus versicolor* und dem Mykotoxin Sterigmatocystin in zwei von acht untersuchten Hausstaubproben unbekanntes Alters aus Haushalten mit sichtbaren Feuchtigkeitsschäden. 43 % der von Tuomi et al. (2000) analysierten Baumaterialproben enthielten ein oder mehrere Mykotoxine. Im Staub von 2 m<sup>2</sup> Teppichboden aus mit Schimmelpilzen belasteten Räumen wurden die Mykotoxine Gliotoxin, Sterigmatocystin und Citrinin qualitativ mittels Flüssigkeitschromatographie und Tandemmassenspektrometrie nachgewiesen (Rolle-Kampczyk et al. 2001). Die bisherigen Ergebnisse lassen sich nur schwer miteinander vergleichen, da sehr unterschiedliche Verfahren zur Sammlung und Probenvorbereitung von Hausstaub eingesetzt wurden. Der Untersuchung von Hausstaub kommt eine besondere Bedeutung zu, da der Hausstaub als Passivsammler fungiert. Partikel, Sporen sowie mittel- und schwerflüchtige Verbindungen akkumulieren im Hausstaub (Butte und Heinzow 2002). Daten zum Vorkommen von Mykotoxinen in Haushalten mit und ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum liegen bislang nicht vor.

Meine Arbeiten hatten zum Ziel, eine spurenanalytische Untersuchungsmethodik auf Basis von flüssigkeitschromatographischen Trennverfahren und massenspektrometrischer Detektion für Mykotoxine in Materialien des Innenraums zu entwickeln und anzuwenden. Neben der sensitiven und selektiven Quantifizierung von Mykotoxinen im Hausstaub sollten auch Analysenmethoden zum Nachweis von Mykotoxinen beim Fehlen von Referenzsubstanzen entwickelt werden. Die entwickelten Nachweisverfahren sollten zur Ermittlung von Hintergrundwerten an 500 Hausstaubproben aus einem bevölkerungsrepräsentativen Kollektiv sowie jeweils mindestens 150 selbst gesammelten Hausstaubproben aus Haushalten mit („Schadensfallproben“) und ohne („Kontrollproben“) sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum angewendet werden. Zur Differenzierung von Einflussfaktoren, wie der Gebäudestruktur und -beschaffenheit oder das Nutzungsverhalten der Bewohner, auf das Vorkommen von Mykotoxinen im Hausstaub der selbst gesammelten Fall- und Kontrollproben sollte eine Auswertung der Proben anhand eines Fragebogens erfolgen.

## 2 Grundlagen

In diesem Kapitel ist der Stand der Forschung und Technik zum Vorkommen und Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub aufgeführt.

### 2.1 Hausstaub

Die Zusammensetzung von Hausstaub ist sehr heterogen und stark von der individuellen Beschaffenheit des Wohnraums und den Lebensgewohnheiten der Bewohner abhängig. Typische Bestandteile sind: Haare, Blätter, Sand, Faserabrieb, Pollen und Mikroorganismen (Butte 2004). Abbildung 1 zeigt eine mikroskopische Aufnahme und Abbildung 2 eine rasterelektronenmikroskopische Vergrößerung typischer Bestandteile in der gesiebten Hausstaubfraktion ( $\leq 63 \mu\text{m}$ ). Der Anteil an organischer Substanz (gemessen mit Hilfe des Glühverlustes) im Hausstaub kann zwischen  $< 5\%$  und  $> 95\%$  betragen (Butte und Walker 1994). Die Gehalte an verschiedenen Inhaltsstoffen können in unterschiedlichen Staubfraktionen stark differieren (Butte und Walker 1994, Walker et al. 1999).

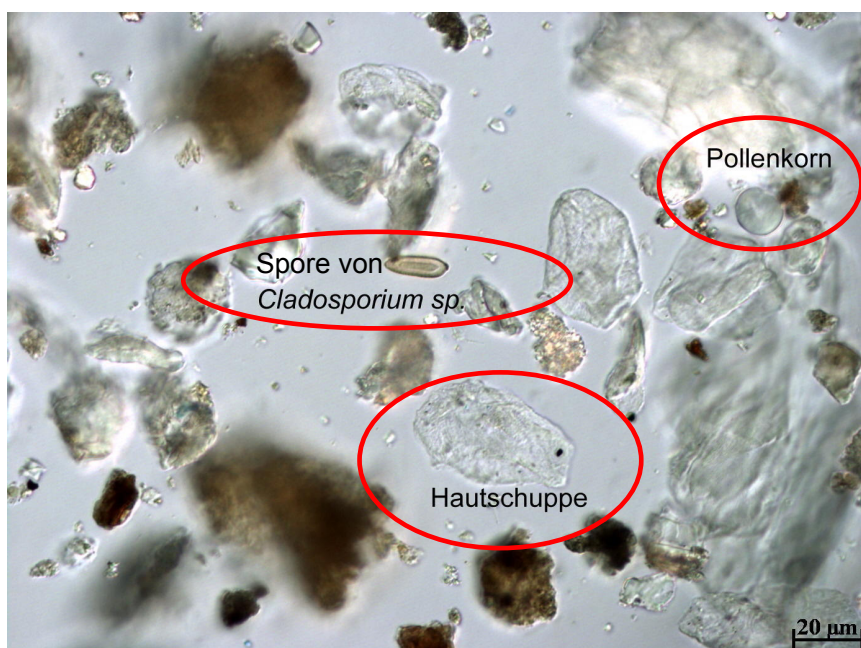


Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahme von typischen Inhaltsstoffen der Hausstaubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$



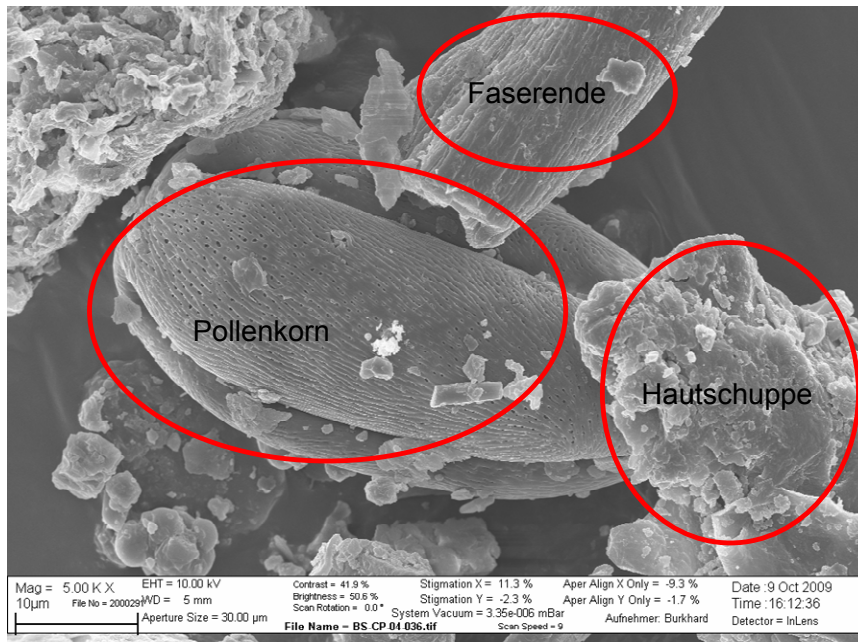


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Pollenkorns, eines Faserendes und von Hautschuppen in der Hausstaubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$

Bei der Expositionsanalyse von mittel- und schwerflüchtigen Verbindungen in Materialien des Innenraums kommt dem Hausstaub eine besondere Rolle zu, da er aufgrund seiner Passivsammlerfunktion eine Senke für wenig flüchtige Verbindungen darstellt (Butte und Heinzow 2002). Die Analyse von Hausstaub liefert durch die Akkumulation Langzeitinformationen über Schadstoffe im Innenraum wie z.B. das Vorkommen des Fungizids Pentachlorphenol (PCP) oder des Insektizids Lindan in Anstrichfarben (Umweltbundesamt 1997, Butte 1999). Deshalb sind sowohl die Probenahme von Hausstaub als auch einige Nachweisverfahren von der Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI- und DIN- Normenausschuss reglementiert worden (VDI-RICHTLINIEN 2001, 2008). Bei der Probennahme wird zwischen Frisch- und Altstaub unterschieden. Die Sammlung kann passiv nach Deposition (abgelagerter Staub) oder aktiv durch Saugen bzw. Wischen von inerten Oberflächen erfolgen. Frischstaub wird meist 7 Tage nach einer Grundreinigung von einer definierten Fläche durch einen geschulten Probennehmer gesammelt. Staub unbekanntes Alters wird als Altstaub bezeichnet, dieser kann sehr einfach von den Bewohnern mit einem normalen Staubsauger gesammelt werden und eignet sich deshalb für größere Studien (Seifert et al. 2000, Friedrich et al. 2001, Schulz et al. 2007, Müssig-Zufika et al. 2008). Allerdings gibt es keine einheitliche Regelung zur Probenvorbereitung und Analyse von Hausstaub (Butte 2004). Um eine homogene Probe zu erhalten, die reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse ermöglicht, ist eine stufenweise Siebung

des Staubes von Hand nach DIN 66165-2 (DIN 1987b) über 2 mm und 63 µm Siebe erforderlich (Butte 1999).

Der Nachweis von Schadstoffen im Hausstaub ist gesundheitlich relevant, da diese inhalativ, digestiv oder dermal auch über den Hausstaub aufgenommen werden können. So betragen die mittleren Aufnahmeraten von Hausstaub inhalativ 0,4-1 mg/d, oral 0,6-100 mg/d und dermal 0,2 mg/(cm<sup>2</sup> d) (Sagunski 1995). Letztes entspricht bei einem Erwachsenen mit 2 m<sup>2</sup> Hautoberfläche und 25 % freier Kontaktfläche einer Exposition von 1000 mg (Sagunski 1995). Die individuellen Werte hängen entscheidend vom Alter, den Lebensgewohnheiten und der Aufenthaltszeit in Innenräumen ab (Sagunski 1995, Ertl 2006). Für Biozide wie z.B. Permethrin und Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) oder polychlorierte Biphenyle (PCB) ist neben der inhalativen auch die dermale oder digestive Aufnahme von relevanten Mengen in den menschlichen Körper aus Hausstaub bekannt (Ertl 2006). Ein wichtiger Faktor bei der Expositionsbeurteilung ist die Tatsache, dass die Menschen in Industrieländern sich täglich zu über 65 % ihrer Zeit in ihren Wohnräumen aufhalten (Brasche et al. 2003). Insgesamt halten sie sich durchschnittlich zu 80-90 % in geschlossenen Räumen auf und sind somit Kontaminationen im Innenraum ausgesetzt (Friedrich et al. 2001, Mekel et al. 2007b).

Mit der Analyse von Hausstaub können auch Aussagen über die Mobilität von Sporen und Partikeln in einem Raum gemacht werden (Morawska und Salthammer 2003). Jedoch wird Hausstaub zum Nachweis von Schimmelpilzen und ihren Metaboliten bisher recht selten untersucht. Die Bestimmung von Schimmelpilzen kann durch mikrobiologische Techniken wie Kultivierung auf geeigneten Nährmedien oder anhand der Gesamtsporenzahl erfolgen (Toepfer 2010), des Weiteren ist ein Nachweis auch anhand von chemischen Indikatoren möglich (Toepfer und Butte 2009). Ein Nachweis von Mykotoxinen erfolgte bislang nur an artifiziellen und fallinduzierten Baustoff- bzw. Hausstaubproben (Jarvis und Miller 2005, Bloom et al. 2009). Für die Untersuchung dieser Stichproben bzw. kleinen Kollektive wurden als analytische Nachweisemethoden die Gas- oder Flüssigkeitschromatographie verwendet.

## 2.2 Schimmelpilze

Schimmelpilze gelten als ubiquitär verbreitet. Der Begriff Schimmelpilze verweist auf keine systematische Einheit, sondern ist eine Sammelbezeichnung für die gleiche morphologische Erscheinung und bezieht sich auf das oberflächlich wachsende weiße bis kräftig gefärbte, pelzartige Myzel das manche Pilze ausbilden (Frössel 2006). Als terrestrische, saprophytisch lebende Pilze zersetzen sie abgestorbene organische Substanzen, wodurch sie einen wichtigen Beitrag zum Stoffkreislauf unseres Ökosystems leisten. Beim Vorkommen von Schimmelpilzen und ihrer Stoffwechselprodukte in Innenräumen oder auf Lebens- und Futtermitteln können negative Eigenschaften wie Sensibilisierung, Allergien oder toxische Wirkungen in Erscheinung treten (Bennett und Klich 2003, Bhat et al. 2010).

Der Lebenszyklus beginnt zunächst mit einer vegetativen Entwicklung (Trophophasse). Die während des Verlaufs dieser Phase stattfindenden metabolischen Reaktionen werden als Primärstoffwechsel bezeichnet und dienen dem Zuwachs an Biomasse. Änderungen der abiotischen Faktoren oder die Verarmung des Mediums an verwertbarem Substrat induzieren die stationäre Phase (Idiophase) und damit die Umstellung auf den sekundären Metabolismus (Mücke und Lemmen 1999). Typische Sekundärmetabolite sind Antibiotika und Mykotoxine (Kück et al. 2009). Zeitgleich beginnt die fruktifikative Phase, um das Fortbestehen des eigenen Stammes sicherzustellen. Für die Verbreitung sind Sporen die häufigste Form. Sie können sowohl sexuell (teleomorph) als auch asexuell (anamorph) gebildet werden. Beherrscht ein Pilz beide Mechanismen, wird er als perfekter Pilz bezeichnet. Fehlt dagegen die sexuelle Vermehrung oder ist sie bisher nicht bekannt, spricht man von einem imperfekten Pilz (Deuteromyzeten).

Einflüsse auf das Wachstum von Schimmelpilzen haben das Nährstoffangebot, der pH-Wert, die Temperatur und die Menge des verfügbaren Wassers, die in der Biologie als Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert) bezeichnet wird (Nielsen 2002). Zudem sind Pilze auch in der Lage, Licht wahrzunehmen. Bei manchen Arten sind sogar Rezeptoren für verschiedene Wellenlängen bekannt.

Viele Schimmelpilzspezies, die aus dem Bereich der Lebens- und Futtermittelkontaminationen bekannt sind, kommen auch in Innenräumen vor (Samson et al. 2002, Hankammer und Lorenz 2007). Die Bestimmung der Arten und Spezies erfolgt meistens mikroskopisch anhand von Vergleichen mit der Literatur (Samson et al. 2002).

Auch makroskopisch lassen sich einzelne Gattungen differenzieren. Zur Hygienekontrolle in Lebensmittelbetrieben, aber auch in der Innenraumanalytik wird zur Probenahme häufig die aktive Abscheidung von Partikeln aus der Luft auf ein Filtermedium eingesetzt. Für den Innenraum sind auch Verfahren zur Bestimmung von kultivierbaren Schimmelpilzen aus Hausstaub als Nachweisverfahren beschrieben (Gabrio et al. 2005a, Toepfer et al. 2010). Verschiedene Studien haben sich mit der Bewertung von kultivierbaren Schimmelpilzen in Frischstaub beschäftigt (Schleibinger et al. 2004, Trautmann et al. 2005, Baudisch et al. 2009b). Häufig werden in Innenräumen *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium* und *Penicillium spp.* nachgewiesen (Gabrio et al. 2005b, Trautmann et al. 2005, Baudisch et al. 2009a). Im Hausstaub sind überwiegend die Spezies *Aspergillus versicolor*, *Eurotium herbariorum*, *Penicillium chrysogenum* und *Wallemia sebi* nachweisbar (Toepfer et al. 2010). Neben diesen toxischen Arten sind auch weitere Schimmelpilze in Materialien des Innenraums nachweisbar, die giftige Metabolite bilden können. Darüber hinaus wird häufig der Schimmelpilz *Stachybotrys chartarum* im Innenraum nachgewiesen, der bevorzugt auf sehr feuchten cellulosehaltigen Materialien wächst (Jarvis et al. 1995, Nielsen et al. 2002, Masten 2004). Die gesundheitsschädliche Wirkung dieses Schimmelpilzes und seiner Metabolite wird kontrovers diskutiert (Miller et al. 2003, Masten 2004, Islam et al. 2009).

Für das Wachstum von Schimmelpilzen ist neben einem verwertbaren Substrat die Menge an biologisch verfügbarem Wasser (Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert) = Quotient des Wasserdampfdrucks über einem Substrat zu dem Wasserdampfdruck über reinem Wasser bei derselben Temperatur) entscheidend. Die Schimmelpilze lassen sich danach in drei Gruppen einteilen. Tabelle 1 listet für die drei Gruppen „primär“, „sekundär“ und „tertiär“ typische Schimmelpilze, die z. B. auf Baumaterialien wachsen können, auf (Grant et al. 1989, Nielsen 2002).

Tabelle 1: Einteilung der Schimmelpilze im Innenraum anhand der Wasseraktivität

Gruppe	Wasseraktivität $a_w$ [%]	Beispiel Spezies
Primär	< 0,8	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Eurotium herbariorum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> und <i>Wallemia sebi</i>
Sekundär	0,8 -0,9	<i>Alternaria spp.</i> , <i>Cladosporium spp.</i>
Tertiär	> 0,9	<i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Chaetomium spp.</i>

### 2.3 *Mykotoxine*

Als Mykotoxine werden toxische, sekundäre Metabolite der Deuteromyceten und der Ascomyceten (Schlauchpilze) bezeichnet (Mücke und Lemmen 1999). In der Regel sind diese Verbindungen selbst bei 100 °C noch stabil und können z. B. bei der Zubereitung von Speisen nicht zerstört werden (Pineda-Valdes und Bullerman 2000, Raters und Matissek 2008). Zur Gruppe der bekannten Mykotoxine zählen mehr als 350 verschiedene Substanzen, die sich durch ihre chemische Struktur in etwa 25 Gruppen einteilen lassen (Cole et al. 2003, Cole und Schweikert 2003a, 2003b, Nielsen und Smedsgaard 2003). Sie wirken immunsuppressiv, hepatotoxisch, nephrotoxisch, karzinogen, zytotoxisch, mutagen und teratogen (Bennett und Klich 2003, Bhat et al. 2010). Nur etwa 15 % der bisher bekannten Mykotoxine bzw. Metabolite sind als Referenzsubstanzen kommerziell verfügbar. Für die übrigen Substanzen ist die Entwicklung empfindlicher quantitativer Analysemethoden bislang unmöglich (Nielsen und Smedsgaard 2003, Islam et al. 2009).

Es gibt keine gesicherten Aussagen darüber, welche Funktionen die Mykotoxine im Leben der Schimmelpilze ausüben (Mayer et al. 2007a). Generell ist bekannt, dass sie in Abhängigkeit von biotischen und abiotischen Faktoren innerhalb des sekundären Metabolismus gebildet werden (Nielsen 2002, Islam et al. 2009). Die optimalen Bedingungen für eine hohe Toxinproduktion sind von Stamm zu Stamm unterschiedlich. Im Übrigen ist ein üppiges Wachstum nicht gleichbedeutend mit einer hohen Toxinproduktion und umgekehrt (Nielsen 2002). Tendenziell scheint eine hohe Feuchtigkeit, eine hohe Temperatur sowie ein längerer Wachstumsprozess die Mykotoxinbildung positiv zu beeinflussen. Das breite Spektrum der bekannten Mykotoxine kann von einer vielfältigen Anzahl von Schimmelpilzen gebildet werden, wobei eine Pilzart für gewöhnlich mehr als ein Mykotoxin erzeugen kann. Einzelne Toxine oder Toxingruppen können von einer taxonomisch eng begrenzten Gruppe gebildet werden (Cole et al. 2003, Cole und Schweikert 2003a, 2003b). Die für Innenräume relevanten Mykotoxine sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Auswahl von im Innenraum und in Baumaterialien beschriebenen Mykotoxinen

(x = ja; - = keine Angabe)

(Hendry und Cole 1993, Tuomi et al. 1998, Tuomi et al. 2000, Rolle-Kampczyk et al. 2001, Engelhart et al. 2002, Nielsen 2002, Bennett und Klich 2003, Cole et al. 2003, Cole und Schweikert 2003a, 2003b, Nielsen 2003, Toepfer 2010)

Mykotoxin	Toxikologische Wirkung	Hauptproduzierende Spezies	Nachweis in Baumaterial	Nachweis im Innenraum
5-Methoxysterigmato-cystin	zytotoxisch	<i>Aspergillus versicolor</i>	x	x
Aflatoxin B1	kanzerogen, teratogen, immunsuppressiv	<i>Aspergillus flavus</i>	-	x
Alternariol	teratogen	<i>Alternaria sp.</i>	x	-
Alternariolmonomethyl-ether	zytotoxisch	<i>Alternaria sp.</i>	x	-
Atranon B	schwach zytotoxisch	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	x
Chaetoglobosin A (B-J)	zytotoxisch	<i>Chaetomium globosum</i>	x	-
Citrinin	immunsuppressiv, nephrotoxisch, kanzerogen, zytotoxisch	<i>Penicillium expansum</i>	x	x
Deoxynivalenol	kanzerogen, östrogenartig, immunsuppressiv	<i>Fusarium graminearum</i>	-	x
Diacetoxyscirpenol	mutagen, teratogen, immunsuppressiv, zytotoxisch	<i>Fusarium graminearum</i>	x	x
Gliotoxin	zytotoxisch, immunsuppressiv	<i>Aspergillus fumigatus</i>	x	x
Griseofulvin	fertilitätsschädigend, kanzerogen	<i>Memnoniella echinata</i>	-	x
Meleagrין	-	<i>Penicillium chrysogenum</i>	x	-
Mycophenolsäure	zytostatisch	<i>Memnoniella echinata</i>	x	-
Ochratoxin A	hepatotoxisch, nephrotoxisch, kanzerogen, immunsuppressiv, teratogen	<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	x
Orlandin	verzögert das Pflanzenwachstum	<i>Aspergillus niger</i>	x	-
Patulin	kanzerogen, neurotoxisch	<i>Penicillium expansum</i>	x	x

Mykotoxin	Toxikologische Wirkung	Hauptproduzierende Spezies	Nachweis in Baumaterial	Nachweis im Innenraum
Roridin E (Iso, Epi)	hoch zytotoxisch	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	x
Roridin A	hepatotoxisch, nephrotoxisch, kanzerogen, zytotoxisch, immun-suppressiv, neurotoxisch	<i>Myrothecium roridum</i>	x	x
Roridin L-2	-	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	x
Satratoxin G	hoch zytotoxisch, immunsuppressiv, neurotoxisch	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	x
Satratoxin H	hoch zytotoxisch, immunsuppressiv, neurotoxisch	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	x
Sterigmatocystin	kanzerogen, zytotoxisch, immunsuppressiv	<i>Aspergillus versicolor</i>	x	x
T2-Tetraol	zytotoxisch	<i>Fusarium sp.</i>	x	x
Tenuazonensäure	schwach mutagen	<i>Alternaria sp.</i>	x	-
Trichoverrin A (B)	hoch zytotoxisch	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	x
Trichoverrol A (B)	hoch zytotoxisch	<i>Stachybotrys chartarum</i>	-	x
Verrucarlin J	hoch zytotoxisch	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	x
Verrucarol	-	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	x
Verrucosidin	neurotoxisch	<i>Stachybotrys chartarum</i>	x	-

Für einige Mykotoxine sind Grenz- bzw. Richtwerte für bestimmte Lebens- und Futtermittel wegen ihrer toxikologischen Eigenschaften unter anderem von der Europäischen Kommission vorgeschrieben (EU-Kommission 2006b). Basierend auf diesen Daten wurden auch Angaben zur tolerierbaren täglichen Aufnahme (TDI) vom Wissenschaftlichen Komitee für Lebensmittel der Europäischen Kommission definiert (EU-Commission 1996, 2002). Für den Innenraum gibt es für diese Schadstoffe bislang keine verbindlichen Höchstwerte.

## 2.4 Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Schwerflüchtige bzw. polare Substanzen in Gemischen wie Hausstaub können nach der Extraktion mit geeigneten Lösemitteln direkt mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie (LC) getrennt und mit der Massenspektrometrie (MS) sensitiv und selektiv nachgewiesen werden (Engelhart et al. 2002). Eine Derivatisierung, wie sie bei der Gaschromatographie (GC) zur Senkung des Siedepunktes notwendig wäre, ist nicht notwendig (Sauvage et al. 2006, Bloom et al. 2007). Die Extraktion der Analyten sollte möglichst vollständig und vor allem reproduzierbar sein.

Die Auswahl der chromatographischen Trennmethode und der geeigneten Ionisierungstechnik für die Kopplung mit der Massenspektrometrie ist abhängig von der Polarität, der Molekülmasse, der Basizität und der Acidität der Analyten (Abbildung 3) (Niessen und Tinke 1995, Marquet und Lachatre 1999, Reemtsma 2003). Eine große Anzahl von polaren Substanzen mit einer höheren Molekülmasse lässt sich in einem Extrakt direkt mittels LC trennen und durch Elektrosprayionisierung (ESI) mit der MS nachweisen. Die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) ist für kleinere und unpolare Verbindungen als Kopplungstechnik mit der LC geeignet.

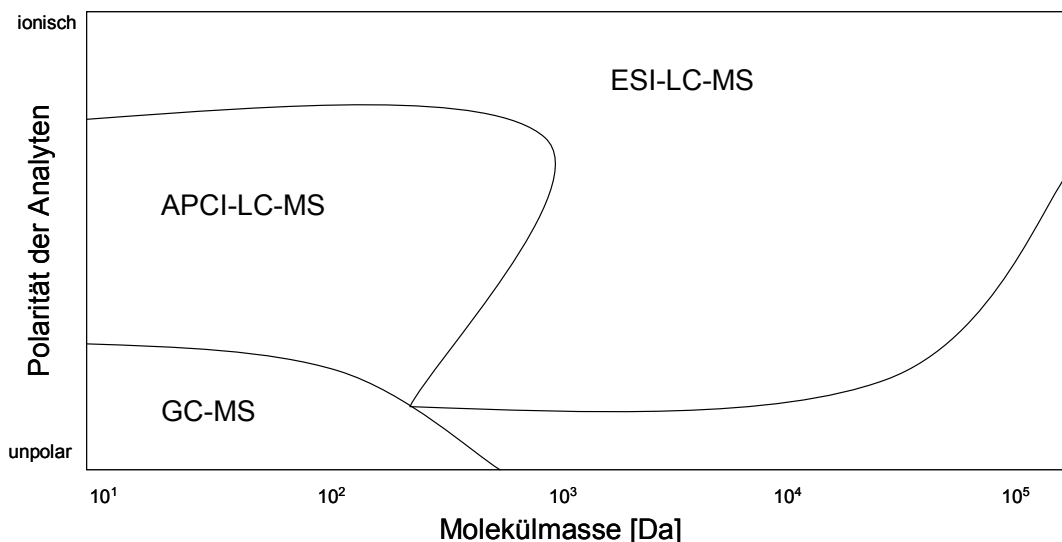


Abbildung 3: Übersicht zwischen der Polarität der Analyten, der Molekülmasse und den möglichen Messtechniken



### **2.4.1 Flüssigkeitschromatographie**

Die Chromatographie ist heute in allen Naturwissenschaftsbereichen die am häufigsten eingesetzte analytische Trennmethode für Gemische. Sie wurde 1901 zum ersten Mal von dem russischen Botaniker Mikhail Tswett zur Trennung von Pflanzenfarbstoffen angewandt. Die farbigen Banden der getrennten Substanzen verliehen dieser Technik ihren Namen. Chromatographie ist griechisch und bedeutet Farbeschreiben (Otto 2006).

Bei der Chromatographie wird eine Probe zunächst in einem geeigneten Lösemittel gelöst, um dann an einer mit der mobilen Phase nicht mischbaren stationären Phase vorbei bewegt zu werden. Das Verteilungsgleichgewicht zwischen den beiden Phasen und den in der Probe enthaltenen Analyten stellt sich durch verschiedene Wechselwirkungen ein. Dabei wird je nach ausgenutztem Wechselwirkungsmechanismus zwischen der Trennung nach Affinität, Größe, Ladung, Adsorption oder Polarität unterschieden. Die Komponenten, die von der stationären Phase durch einen oder mehrere dieser Effekte stärker zurückgehalten werden, bewegen sich langsamer und erreichen das Ende der stationären Phase demnach zeitlich später als die Komponenten, die kaum von der stationären Phase zurückgehalten werden. Als mobile Phase werden in der Flüssigkeitschromatographie häufig Lösungsmittel wie Methanol, Acetonitril oder 2-Propanol, gemischt mit Wasser, eingesetzt. Sollen sich die Eigenschaften der mobilen Phase im zeitlichen Verlauf zwecks Optimierung der Trennung ändern, so wird ein Lösemittelgradient eingesetzt. Die Retentionszeit, also die Verweilzeit des Analyten in der Säule, kann wie auch die Trenneffizienz bzw. -selektivität durch die Elutionskraft des Lösemittels, den pH-Wert, die Temperatur, die Flussrate und die Art der stationären Phase variiert werden (Snyder und Kirkland 1979, Neue und Kele 2007, Neue und Mendez 2007). Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) besteht die stationäre Phase in der Chromatographiesäule aus einem monolitischen oder partikulären organischen oder anorganischen Trägermaterial. Neben der Partikelgröße bzw. Porenweite wird die Trennleistung von der Oberflächenmodifikation entscheidend beeinflusst (Meyer 1979, Kromidas 2002). Die am weitesten verbreitete Technik in der Umwelt- und Spurenanalytik ist die Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed Phase, RP), hierbei ist die stationäre Phase unpolarer als die mobile Phase. Typisch sind hydrophobe Octadecyl-, Amin- oder Cyano-Phasen.

Neben selektiven Einzelmethoden zum Nachweis von Mykotoxinen durch Kopplung von HPLC mit verschiedenen Detektortypen auf Basis der Absorption von ultraviolettem Licht (UV), der Fluoreszenz (FLD) oder der Massenspektrometrie (MS), gibt es für den Bereich der Lebens- und Futtermittel verschiedene Übersichtsarbeiten zur Entwicklung von Multimethoden (Sforza et al. 2006, Krska et al. 2008, Songsermsakul und Razzazi-Fazeli 2008, Shephard und Berthiller 2011). Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau eines HPLC-Systems. Die Eluenten werden von den Pumpen zur Homogenisierung in die Mischkammer gefördert. Anschließend wird die Probe über den Injektor in den Lösemittelfluss injiziert. Die chromatographische Trennung der Komponenten erfolgt in der temperierten Trennsäule. Der Nachweis der Substanzen kann mit verschiedenen Detektortypen erfolgen.

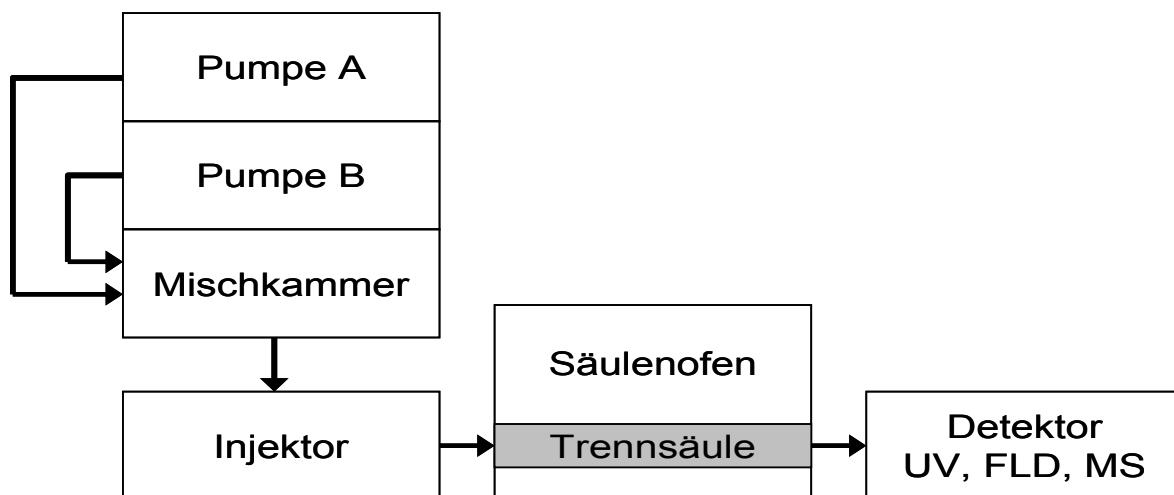


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems.

### 2.4.2 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie werden ionisierte Teilchen erzeugt und ihr Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) bestimmt. Der gemessene numerische Quotient aus der Masse angegeben in atomarer Masseneinheit (u) oder Dalton (Da) und der Anzahl der elementaren Ladungen ( $z$ ) des Ions wird dimensionslos verwendet (De Hoffmann und Stroobant 2007, IUPAC 2011, Mallet und Down 2009, Gross 2011).

Diese vielfältige Messtechnik wird neben der Quantifizierung auch zur Identifizierung und chemischen Charakterisierung eingesetzt (De Hoffmann und Stroobant 2007).

So lassen sich mit der MS das Isotopenmuster von Atomen oder Molekülen, sowie die Summenformeln von Verbindungen bestimmen. Darüber hinaus ist es bei Molekülen möglich, durch gezielte Fragmentierung charakteristische Produktionen zu erzeugen, die Rückschlüsse auf die chemische Struktur der Verbindung ermöglichen (Dass 2007). Im Vergleich zu spektroskopischen Methoden wie z. B. UV-Absorption bietet die MS die Möglichkeit zur sensitiven und selektiven Bestimmung von Spurenstoffen in komplexen Mischungen (Nielsen und Smedsgaard 2003, Reemtsma 2003). Für die Bestimmung von Kontaminanten wie Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln wurde dies in einer Richtlinie von der Europäische Kommission berücksichtigt (EU-Kommission 2002, 2006a). Neben allgemeinen Qualitätskriterien werden für den Nachweis und die Identifizierung von Analyten Mindestkriterien für die chromatographische Trennung und die massenspektrometrische Detektion definiert. Demnach darf ein massenspektrometrischer Nachweis nur nach chromatographischer Trennung verwendet werden. Die Retentionszeit des Analyten muss dabei mindestens doppelt so lang sein wie die Systemdurchflusszeit. Für die massenspektrometrische Detektion von Mykotoxinen sind mindestens drei Identifikationspunkte notwendig. Die Punkteverteilung orientiert sich an der Massengenauigkeit und dem verwendeten Messmodus des Massenspektrometers. Diese Anforderungen an die Messmethoden dienen dem Ausschluss von falschen Ergebnissen durch Störung des Messsignals aufgrund der Probenmatrix. In Abhängigkeit von den Matrixkomponenten kann das Messsignal für den Zielanalyten erhöht oder erniedrigt werden. Diese Matrixeffekte und ihre Möglichkeiten zur Bestimmung werden auch in der Literatur für die Analyse von Medikamenten in biologischen Proben beschrieben (Annesley 2003). Bonfiglio et al. (1999) beschreiben ein graphisches Verfahren bei dem eine Blindprobe über die chromatographische Trennsäule geleitet wird. Zusätzlich wird in diesen Fluss nach der Trennsäule über ein T-Stück die Lösung mit den Referenzsubstanzen zugegeben. Matuczski et al. (1998) beschreiben eine Methodik zur Bestimmung der Wiederfindungsraten durch getrennte Dotierung einer Blindprobe vor der Probenvorbereitung und vor der Messung.

Schematisch verläuft die Massenspektrometrie in drei Schritten. Zu Beginn werden aus Atomen oder Molekülen Ionen erzeugt, wobei auch Cluster oder Fragmente entstehen können. In einem zweiten Schritt werden die in der Gasphase vorliegenden Ionen aufgrund ihres  $m/z$ -Verhältnisses herausgefiltert bzw. getrennt und im dritten Schritt detektiert. Die gemessenen Signale werden als einzelnes Massenspektrum

pro Zeiteinheit aufgezeichnet (Abbildung 5). Die Massenspuren lassen sich summiert als Totalionenchromatogramm oder einzeln für diskrete Massenspuren als extrahierte Chromatogramme darstellen.

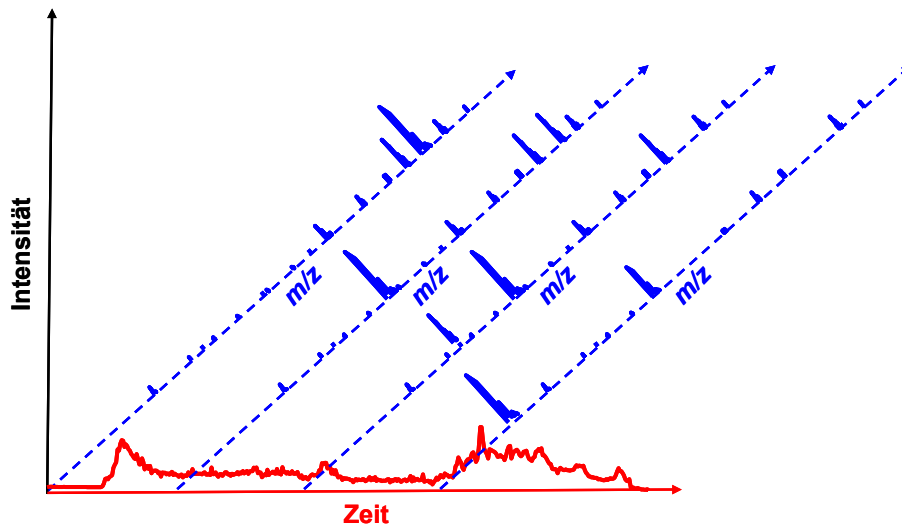


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Messdatenaufnahme mittels LC-MS. Das Chromatogramm stellt den zeitlichen Verlauf der detektierten Massenspektren dar.

Die Analyten müssen nach der Trennung durch die Flüssigkeitschromatographie gasförmig in das Hochvakuum des MS-Systems eingeführt werden, um unerwünschte Reaktionen der Ionen auszuschließen. Dazu wird die Probe mittels eines Sprayverfahrens zerstäubt und das Lösemittel verdampft. In Abhängigkeit von der Polarität und dem Molekulargewicht des Analyten werden meist entweder die Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) oder die Elektrosprayionisation (ESI) als Interface verwendet. Die Elektrosprayionisation ist als weiche Ionisationstechnik für eine Vielzahl Substanzen geeignet, da hiermit auch physikalisch-chemisch unterschiedliche Moleküle mit zufriedenstellender Ausbeute ionisiert werden können (Reemtsma 2003, Thurman et al. 2005). Je nach Polarisation der Ionenquelle können mit APCI oder ESI positiv oder negativ geladene Vorläuferionen erzeugt werden. Diese protonierten  $[M+nH]^{n+}$  oder deprotonierten  $[M-nH]^{n-}$  Ionen werden durch ein elektrisches Feld in Richtung des Massenspektrometers beschleunigt. Zur Analyse des Masse-zu-Ladungsverhältnis werden meist Quadrupol- (Q), Ionenfallen- (IT) oder Flugzeitmassenspektrometer (TOF) eingesetzt. Diese drei Gerätetypen unterscheiden sich in den Messmodi, der Möglichkeit zur Fragmentierung der Ionen und in der Massengenauigkeit.

Bei einem Tripelquadrupolmassenspektrometer (QqQ) sind drei Quadrupole hintereinander geschaltet. Diese Geräte werden auch als Tandemmassenspektrometer (MS/MS) bezeichnet und verfügen über eine hohe Selektivität und Sensitivität, weshalb diese Geräte immer häufiger zur Bestimmung von organischen Spurenstoffen in der Umwelt- oder Lebensmittelanalytik eingesetzt werden. So wird diese Methodik unter anderem in der Arbeitsschutz- und Umweltanalytik zur Bestimmung von Arzneimitteln (Türk 2007, Wang et al. 2009) oder von Transformationsprodukten durch oxidative Prozesse (Zedda et al. 2010) angewendet. Sulyok et al. (2007a) beschreiben eine Methode zum Nachweis von Mykotoxinen in Getreide. Verschiedene Beiträge liefern eine Übersicht über die Anwendungsmöglichkeiten dieser Messtechnik (Reemtsma 2003, Krska et al. 2008, Songsermsakul und Razzazi-Fazeli 2008, Bhat et al. 2010, Guillarme et al. 2010, Shephard und Berthiller 2011). Mit Hilfe der HPLC-MS/MS wurden auch Mykotoxine in Luftproben aus Wohnräumen oder in Innenraummaterialien nachgewiesen (Gottschalk et al. 2006, Bloom 2008, Gottschalk et al. 2008, Bloom et al. 2009). In der von Vishwanath et al. (2009) beschriebenen Methode sind neben Mykotoxinen auch Metabolite von Bakterien enthalten.

In QqQ Hybridmassenspektrometern kann der dritte Quadrupol auch als lineare Ionenfalle (Linear Ion Trap, LIT) fungieren (Abbildung 6). Hierdurch wird es möglich Ionen dynamisch und effizient zu akkumulieren oder zu fragmentieren und dann erst dem Detektor zuzuleiten. Die Anreicherung von Ionen in der LIT, ermöglicht sensitivere Messmodi gegenüber Tandemmassenspektrometern wie z.B. von Suchläufen über einen großen Massenbereich (EMS) oder von Produktionenspektren (EPI) (Hopfgartner et al. 2004).

In einer Ionenfalle wird ein Massenanalysator verwendet, um zeitlich getrennt Ionen zu akkumulieren und zu fragmentieren (Tandem in time). Bei Tandemmassenspektrometern wird dies räumlich getrennt durchgeführt (Tandem in space). Der konsekutive Aufbau in einem Hybridmassenspektrometer vereint durch zwei getrennte Massenanalysatoren die beiden Messprinzipien und –funktionalitäten. Es ermöglicht schnellere Messzyklen, da keine Isolierungszeiten für MS/MS Experimente notwendig sind und einen größeren dynamischen Bereich bei der Quantifizierung gegenüber Ionenfallengeräten (King und Fernandez-Metzler 2006). Für die Gehaltsbestimmung wird bei der Tandemmassenspektrometrie meist der Selected-Reaction-Monitoring (SRM) oder Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) Modus angewendet (Gross 2011). Hierbei wird im ersten Quadrupol (Q1) ein diskretes Ion ausgewählt, in

der Kollisionszelle (q2) gezielt fragmentiert und in Quadrupol (Q3) ein (SRM) bzw. mehrere (MRM) Produktionen bestimmt. Der gleiche Ablauf wird auch bei der Bestimmung von Produktionenspektren (PI) ausgewählter Vorläuferionen genutzt, wobei im Gegensatz zum SIM oder MRM alle gebildeten Fragmente des Vorläuferions im Q3 ausgelesen werden.

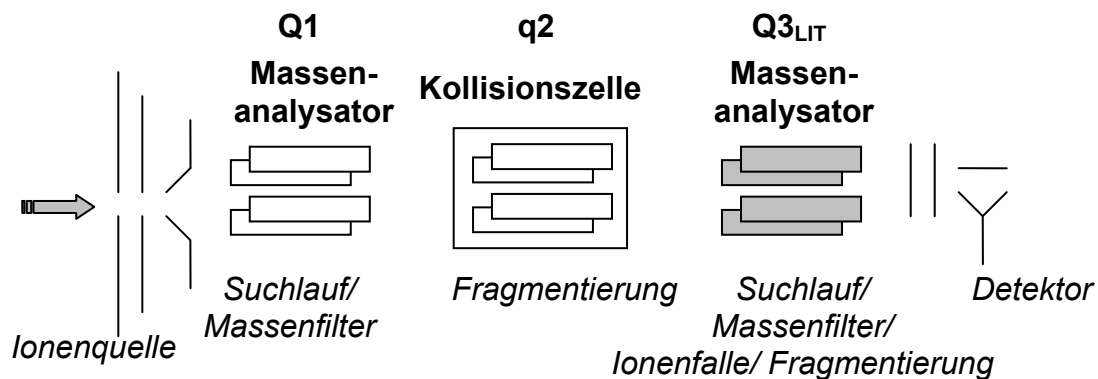


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Triplequadrupolmassenspektrometers mit linearer Ionenfalle

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über verschiedene Messmodi, die mit einem Hybridmassenspektrometer verwendet werden können. Mit Hilfe von geeigneter Software lassen sich bei einer Messung verschiedene Experimente im MS automatisiert kombinieren (Information depended acquisition, IDA) (Abbildung 7). Damit lassen sich die Informationen über eine Probe innerhalb eines Chromatographielaufes steigern (Li et al. 2007). Es ermöglicht ein selektives und sensibles Screening nach unbekanntem Analyten bzw. beim Fehlen von Referenzsubstanzen. Gros et al. (2008) nutzten IDA zur Bestimmung von  $\beta$ -Blockern in Abwasserproben. Auch zum Nachweis und zur Strukturidentifikation von pharmazeutischen Metaboliten in Plasma- und Urinproben wurden IDA-Methoden erfolgreich eingesetzt (Li et al. 2007). In der Forensik wird diese Methodik zum Nachweis von pharmazeutischen Wirkstoffen eingesetzt, indem die Produktionenspektren mit den Einträgen in einer Spektrenbibliothek verglichen werden (Marquet und Lachatre 1999, Weinmann 2001, Oberacher et al. 2009b, 2009a). Diese Datenbanken sind im Gegensatz zu der aus der GC-MS bekannten (NIST 2011), aufgrund der stärkeren Abhängigkeit der Massenspektren von den verwendeten Analysegeräten und Einstellungen, viel weniger verbreitet und detailliert (Maurer und Peters 2005).

Tabelle 3: Übersicht über verschiedene Messmodi eines Hybridmassenspektrometers

Messmodi	Q1	q2	Q3
Q1 Suchlauf	$m/z$ - Suchlauf	Ionenstrahltransmission	Ionenstrahltransmission
Q3 Suchlauf	Ionenstrahltransmission	Ionenstrahltransmission	$m/z$ - Suchlauf
Selected-Reaction-Monitoring (SRM)	$m/z$ - Auswahl	Fragmentierung	$m/z$ - Auswahl eines Ions
Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)	$m/z$ - Auswahl	Fragmentierung	$m/z$ - Auswahl mehrerer Ionen
Erweiterter Suchlauf (EMS)	Ionenstrahltransmission	Ionenstrahltransmission	Akkumulation und $m/z$ - Suchlauf im Ionenfallenmessmodus
Erweitertes Produktionsspektrum (EPI)	$m/z$ - Auswahl	Fragmentierung	Akkumulation und $m/z$ - Suchlauf im Ionenfallenmessmodus

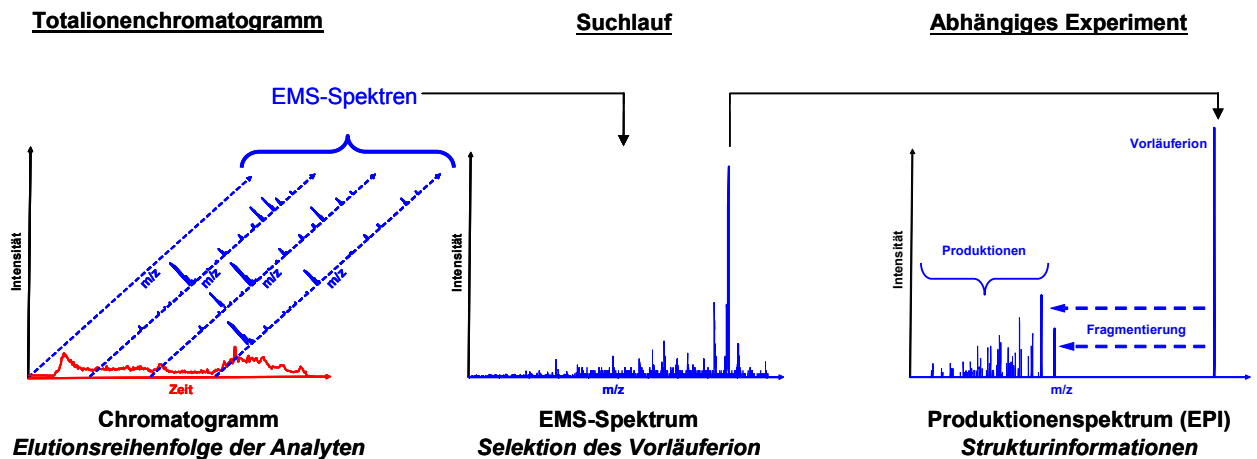


Abbildung 7: Schematischer Ablauf von informationsabhängigen Experimenten (IDA) im MS bei einer Messung. Das dominante Vorläuferion wird im Suchlauf selektiert und im abhängigen Experiment gezielt fragmentiert.

Das Konzept der Selektion von Vorläuferionen und Fragmentierung mittels Quadrupolen wird auch in Kombination mit Flugzeitmassenspektrometern eingesetzt (Abbildung 8) (Pavlic et al. 2006). Diese als QTOF bezeichneten Geräte vereinen die Möglichkeiten der Tandemmassenspektrometrie mit der hohen Massengenauigkeit eines Flugzeitmassenspektrometers (TOF) (Petrovic et al. 2006). Im TOF werden die Ionen in Abhängigkeit von ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis mit sehr hoher Auflösung getrennt (De Hoffmann und Stroobant 2007). Somit lassen sich die möglichen Summenformeln von Vorläuferionen und Produktionen genau bestimmen bzw. die Anzahl der möglichen Elementzusammensetzung unter anderem durch das Isotopenmuster sehr stark reduzieren. Bei der Angabe der Messergebnisse wird die Diffe-

renz vom gemessenen zum theoretischen Wert als Massengenauigkeit bezeichnet und in Dalton oder als relative Abweichung in Promille (ppm) angegeben (Dass 2007, De Hoffmann und Stroobant 2007). Durch die Kombination von hoher Massenauflösung und Möglichkeit zur Fragmentierung sind der Nachweis und eine Strukturidentifizierung eines Analyten auch ohne Referenzsubstanzen im Spurenbereich möglich (Krauss et al. 2010, Portner et al. 2010). Hernandez hat verschiedene Geräte (Trippelquadrupolmassenspektrometer (QqQ), TOF und QTOF) zur Bestimmung von Pestiziden miteinander verglichen (Hernandez et al. 2004). QqQ zeichnet eine hohe Sensitivität aus, während mit einem TOF oder QTOF Auswertungen von neuen Analyten, Metaboliten oder Transformationsprodukten auch retrospektiv möglich sind (Zwiener 2004, Kosjek et al. 2008).

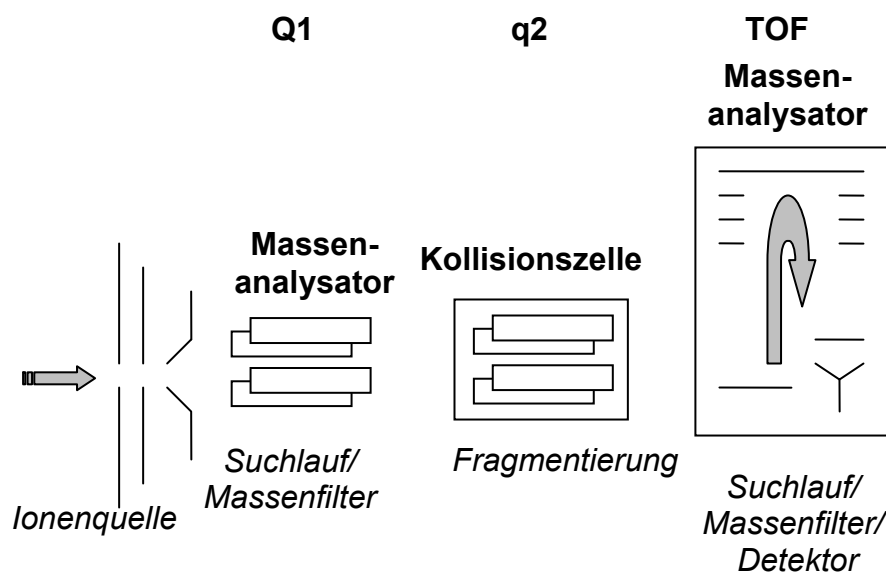


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Quadrupolflugzeitmassenspektrometers (QTOF)

Darüber hinaus gibt es noch weitere Arten von Massenspektrometern wie Sektorfeld, Ionenfallen oder Fourier-Transformation, die sich in der zur Verfügung stehenden Messmodi, der Massengenauigkeit, dem dynamischen Messbereich und der Empfindlichkeit unterscheiden (Dass 2007, De Hoffmann und Stroobant 2007, Gross 2011). Diese Gerätetypen werden weniger zur Quantifizierung, sondern häufiger zur Identifizierung und chemischen Charakterisierung verwendet.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Geräte

Details zu den verwendeten Chemikalien (Tabelle 45) und Geräten (Tabelle 46) sind im Anhang aufgeführt. Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a. Qualität eingesetzt. Die Geräte wurden regelmäßig kalibriert bzw. gewartet.

#### 3.2 Ausgewählte Mykotoxine

Für die Methodenentwicklung wurden acht Mykotoxine aufgrund ihrer toxikologischen Eigenschaften, ihrem möglichen Vorkommen im Innenraum und der Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen ausgewählt (Portner et al. 2007, Portner et al. 2008b). Darüber hinaus wurden qualitative Nachweismethoden für ausgewählte makrocyclische Trichothecene entwickelt (Portner et al. 2009a, Portner et al. 2009c). Die nachfolgenden Daten der Mykotoxine wurden mit Hilfe der Software EPI Suite 4.0 und ACD/Labs 12, sowie der Online-Datenbank (<http://www.chemspider.com>) recherchiert.

#### Aflatoxin B<sub>1</sub>

Das Aflatoxin B<sub>1</sub> gehört zur Gruppe der Aflatoxine, die über zehn verschiedene Verbindungen umfasst und ist eine der stärksten kanzerogenen Verbindungen natürlichen Ursprungs. Abbildung 9 zeigt die Strukturformel des Aflatoxin B<sub>1</sub> und Tabelle 4 fasst Bezeichnungen und einige physikalisch-chemische Eigenschaften zusammen.

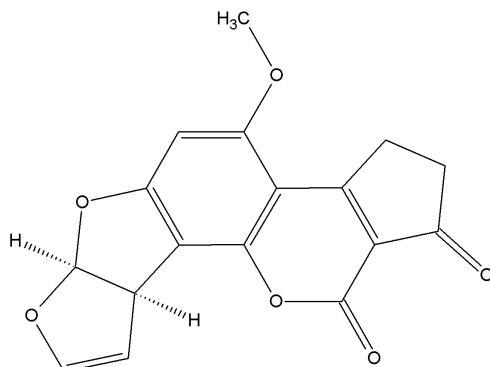


Abbildung 9: Strukturformel von Aflatoxin B<sub>1</sub>

Tabelle 4: Bezeichnungen und Eigenschaften des Aflatoxin B<sub>1</sub>

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	2,3,6α,9α-Tetrahydro-4-methoxycyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3- <i>h</i> ][ <i>l</i> ]benzopyran-1,11-dione
<b>Synonyme</b>	AfB <sub>1</sub> , 6-Methoxydifurocoumarone
<b>CAS-Nummer</b>	1162-65-8
<b>Summenformel</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molare Masse</b>	312,28 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	918 mg/L bei 25 °C
<b>log K<sub>ow</sub></b>	1,23

### Citrinin

Citrinin kann von verschiedenen Schimmelpilzspezies gebildet werden. Es ist nephrotoxisch. In Abbildung 10 ist die Strukturformel abgebildet. Die Tabelle 5 listet die Bezeichnungen und Eigenschaften von Citrinin auf.

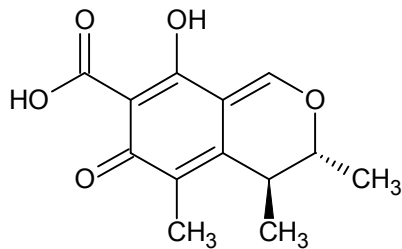


Abbildung 10: Strukturformel von Citrinin

Tabelle 5: Bezeichnungen und Eigenschaften des Citrinin

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	(3R,4S)-8-Hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-4,6-dihydro-3H-isochromene-7-carboxylic acid
<b>CAS-Nummer</b>	518-75-2
<b>Summenformel</b>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molare Masse</b>	250,2473 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	24,09 g/L bei 25 °C
<b>log K<sub>ow</sub></b>	0,45
<b>pK<sub>s</sub></b>	1,52 ± 0,6

## Deoxynivalenol

Deoxynivalenol wird wegen seiner Eigenschaft in toxischen Dosen Übelkeit und Erbrechen hervorzurufen, auch als Vomitoxin (to vomit = sich erbrechen) bezeichnet. Es gehört zu den gut wasserlöslichen Mykotoxinen aus der Gruppe der Trichothecene (Abbildung 11 und Tabelle 6).

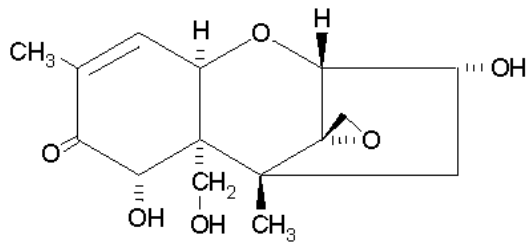


Abbildung 11: Strukturformel von Deoxynivalenol

Tabelle 6: Bezeichnungen und Eigenschaften des Deoxynivalenol

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	12,13-epoxy-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihydroxy-trichothec-9-en-8-one
<b>Synonyme</b>	DON, Rd-Toxin, 4-Deoxynivalenol, Dehydronivalenol, Vomitoxin
<b>CAS-Nummer</b>	51481-10-8
<b>Summenformel</b>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molare Masse</b>	296,32 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	51,75 g/L bei 25 °C
<b>log K<sub>ow</sub></b>	-0,71
<b>pK<sub>s</sub></b>	11,91 ± 0,7

## Diacetoxyscirpenol

Diacetoxyscirpenol gehört zur Gruppe der Trichothecene und kann von der Gattung *Fusarium* gebildet werden. Es inhibiert die Proteinbiosynthese. Die Abbildung 12 zeigt die Strukturformel. In Tabelle 7 fasst die Bezeichnungen und physikalisch-chemischen Eigenschaften zusammen.

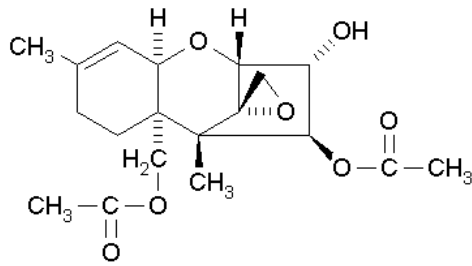


Abbildung 12: Strukturformel von Diacetoxyscirpenol

Tabelle 7: Bezeichnungen und Eigenschaften des Diacetoxyscirpenol

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	(3 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,12 $R$ )-3-Hydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-4,15-diyldiacetat
<b>Synonyme</b>	DAS
<b>CAS-Nummer</b>	2270-40-8
<b>Summenformel</b>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molare Masse</b>	366,4055 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	1018 mg/L bei 25 °C
<b>log K<sub>ow</sub></b>	1,4
<b>pK<sub>s</sub></b>	13,4 ± 0,7

## Gliotoxin

Wegen seiner zytotoxischen Wirkung wird Gliotoxin in der chemotherapeutischen Forschung untersucht (Abbildung 13, Tabelle 8).

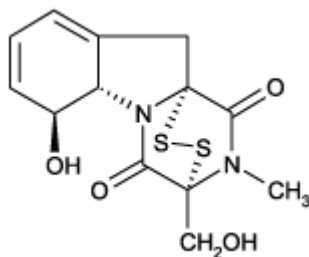


Abbildung 13: Strukturformel von Gliotoxin

Tabelle 8: Bezeichnungen und Eigenschaften des Gliotoxin

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	(3R,5aS,6S,10aR)-6-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methyl-2,3,6,10-tetrahydro-5aH-3,10a-epidithiopyrazino[1,2-a]indole-1,4-dione
<b>CAS-Nummer</b>	67-99-2
<b>Summenformel</b>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>
<b>Molare Masse</b>	326,3913 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	28,46 mg/L bei 25 °C
<b>log K<sub>OW</sub></b>	2,90
<b>pK<sub>s</sub></b>	12,90 ± 0,4

### Ochratoxin A

Aus der Gruppe der Ochratoxine ist Ochratoxin A (OTA) das häufigst untersuchte. Es kann von verschiedenen Spezies gebildet werden. Seinen Namen verdankt es *Aspergillus ochraceus*. Nachfolgend sind die Struktur, Bezeichnungen und die Eigenschaften dargestellt (Abbildung 14 und Tabelle 9).

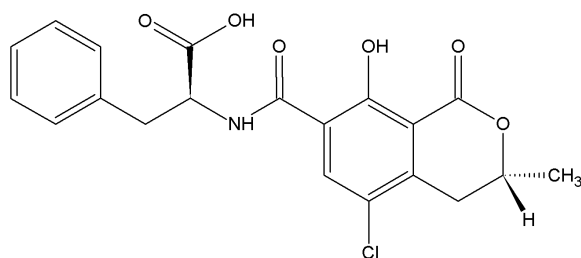


Abbildung 14: Strukturformel von Ochratoxin A

Tabelle 9: Bezeichnungen und Eigenschaften des Ochratoxin A

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	<i>R</i> -N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1 <i>H</i> -2-benzopyran-7-yl)carbonyl]- <i>L</i> -phenylalanine
<b>Synonyme</b>	OA, OTA
<b>CAS-Nummer</b>	303-47-9
<b>Summenformel</b>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>
<b>Molare Masse</b>	403,82 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	0,987 mg/L bei 25 °C
<b>log K<sub>OW</sub></b>	4,74
<b>pK<sub>s</sub></b>	3,29 ± 0,1

## Roridin A

Roridin A ist eine fungizide, zytostatisch wirkende Verbindung. Ihr Schmelzpunkt liegt zwischen 198 °C und 204 °C, weitere Daten sind in Tabelle 10 dargestellt. Roridin A kann von *Myrothecium spp.* gebildet werden (Cole et al. 2003). Trotz struktureller Ähnlichkeiten zu anderen makrocyclischen Trichothecenen wie den Satratoxinen, wird Roridin A nicht von *Stachybotrys chartarum* gebildet werden (Cole et al. 2003). Abbildung 15 zeigt die Strukturformel von Roridin A.

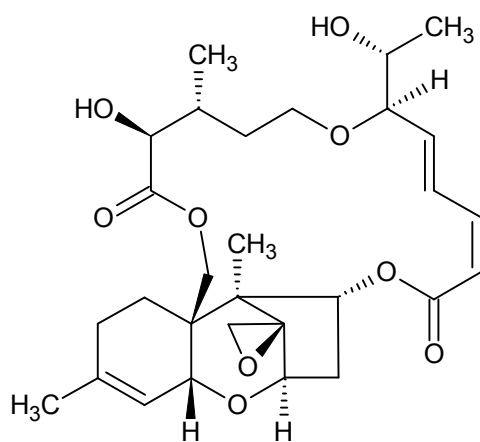


Abbildung 15: Strukturformel von Roridin A

Tabelle 10: Bezeichnungen und Eigenschaften von Roridin A

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	(10Z,12Z)-4-hydroxy-9-(1-hydroxyethyl)-5,16a,21-trimethyl-4,5,6,7,16,16a,22,23-octahydro-3H,18H,19aH-spiro[16,18-methano[1,6,12]trioxacyclooctadecino[3,4-d]chromene-17,2'-oxirane]-3,14(9H)-dione
<b>CAS-Nummer</b>	14729-29-4
<b>Summenformel</b>	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>
<b>Molare Masse</b>	532,630 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	911 mg/L bei 25 °
<b>log K<sub>ow</sub></b>	-0,38
<b>pK<sub>s</sub></b>	12,83 ± 0,7

## Roridin L-2

Roridin L-2 (Abbildung 16, Tabelle 11) ist ein Vorläuferprodukt von Satratoxin bei der Biosynthese von *Stachybotrys chartarum* und gehört zur Gruppe der Trichothecene (Bloem et al. 1983, Islam et al. 2009).

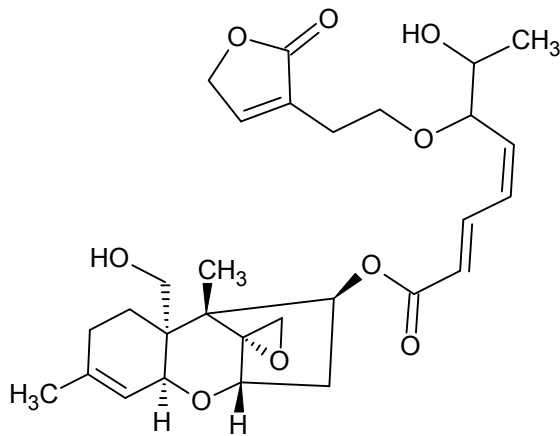


Abbildung 16: Strukturformel von Roridin L-2

Tabelle 11: Bezeichnungen und Eigenschaften von Roridin L-2

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	(4 $\beta$ )-15-hydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-4-yl (2E,4Z)-7-hydroxy-6-[2-(2-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)ethoxy]octa-2,4-dienoate
<b>CAS-Nummer</b>	85124-22-7
<b>Summenformel</b>	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>
<b>Molare Masse</b>	530,61 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	34,42 mg/L bei 25 °C
<b>log K<sub>ow</sub></b>	1,31
<b>pK<sub>s</sub></b>	14,03 ± 0,2

## Satratoxin G

Satratoxin G (Abbildung 17, Tabelle 12) ist ein antibiotisch wirkendes makrocyclisches Trichothecen (es inhibiert die Proteinsynthese), welches von *Stachybotrys chartarum* produziert wird. Es ist ein Stereoisomer (Isosatratoxin G) in der Literatur bekannt (Jarvis et al. 1995). Beide sind nicht als Referenzsubstanzen zu erwerben (Islam et al. 2009).

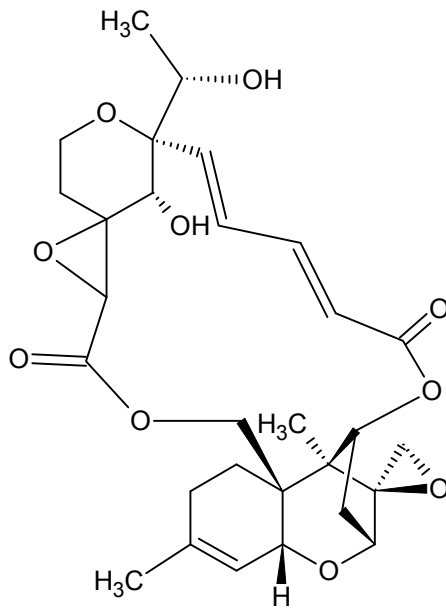


Abbildung 17: Strukturformel von Satratoxin G

Tabelle 12: Bezeichnungen und Eigenschaften des Satratoxin G

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	(6E,8Z,12R,12aS,14R,15aR,19aR)-24-hydroxy-5-(1-hydroxyethyl)-12a,17-dimethyl-2,3,12,12a,18,19-hexahydro-14H,15aH-spiro[1a,5:12,14-dimethanooxireno[8,9][1,6,12]trioxacyclooctadecino[3,4-d]chromene-13,2-oxirane]-10,22(5H,22aH)-dione
<b>Synonyme</b>	Sat G
<b>CAS-Nummer</b>	53126-63-9
<b>Summenformel</b>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>
<b>Molare Masse</b>	544,5901 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	323,7 mg/L bei 25 °C
<b>log K<sub>ow</sub></b>	0,07
<b>pK<sub>s</sub></b>	13,66 ± 0,7

## Satratoxin H

Satratoxin H (Abbildung 18, Tabelle 13) kann von *Stachybotrys chartarum* produziert werden. Es ist ein antibiotisch wirkendes makrocyclisches Trichothecen. In der Literatur ist das Stereoisomer Isosatratoxin H beschrieben (Jarvis et al. 1995), welches genau wie Satratoxin H nicht als Referenzsubstanzen zu erwerben ist (Islam et al. 2009).



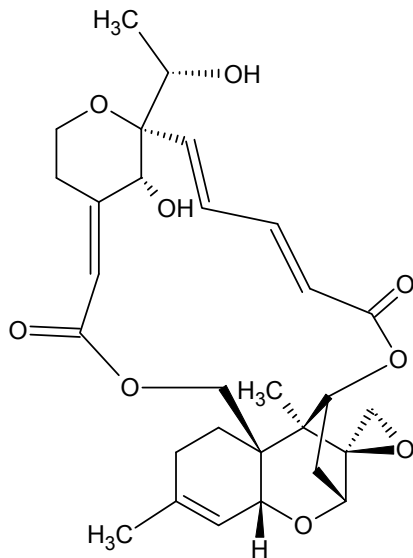


Abbildung 18: Strukturformel von Satratoxin H

Tabelle 13: Bezeichnungen und Eigenschaften des Satratoxin H

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	(4E,9R,10E,12Z,16R,16aS,17R,18R,19aR,23aR,25R)-25-hydroxy-9-[(1S)-1-hydroxyethyl]-16a,21-dimethyl-6,7,16,16a,22,23-hexahydro-3H,18H,19aH-spiro[5,9:16,18-imethano[1,6,12]trioxacyclooctadecino[3,4-d]chromene-17,2'-oxirane]-3,14(9H)-dione
<b>Synonyme</b>	Sat H
<b>CAS-Nummer</b>	53126-64-0
<b>Summenformel</b>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>
<b>Molare Masse</b>	528,598 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	1.006 mg/L bei 25 °C
<b>log K<sub>ow</sub></b>	-0,39
<b>pK<sub>s</sub></b>	12,86 ± 0,7

### Sterigmatocystin

Sterigmatocystin (ST) gehört zur Gruppe der Aflatoxine (Nielsen 2002) (Abbildung 19, Tabelle 14). Es ist kanzerogen und kann von verschiedenen Schimmelpilzspezies u.a. *Aspergillus versicolor* gebildet werden. Dabei kann es einzeln oder auch als Vorläuferprodukt der Aflatoxinbiosynthese vorkommen.

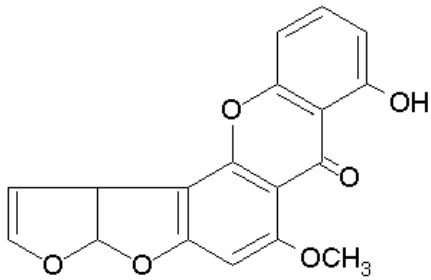


Abbildung 19: Strukturformel von Sterigmatocystin

Tabelle 14: Bezeichnungen und Eigenschaften des Sterigmatocystin

<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	(3aR,12cS)-8-Hydroxy-6-methoxy-3a,12c-dihydro-7H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-c]xanthen-7-on
<b>Synonyme</b>	ST
<b>CAS-Nummer</b>	10048 – 13 – 2
<b>Summenformel</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molare Masse</b>	324,2843 g/mol
<b>Wasserlöslichkeit</b>	1,44 mg/L bei 25 °C
<b>log K<sub>ow</sub></b>	3,81
<b>pK<sub>s</sub></b>	6,92 ± 0,2

### **3.3 Hausstaubproben**

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Kollektive von Hausstaubproben gesammelt und untersucht. Diese werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

#### **3.3.1 Herkunft der Proben**

Um die analytischen Methoden auf Realproben anwenden zu können und damit Informationen über deren Mykotoxingehalt zu erlangen, wurden einerseits Hausstaubkontrollproben aus der Norddeutschen Leukämie- und Lymphomstudie (NLL) (Hoffmann et al. 2008) herangezogen und andererseits weitere Hausstaubproben selber akquiriert. Das Kollektiv der „NLL-Proben“ (n = 500) entstammte aus den mehr als 2500 Kontrollproben der Studie, die in den Jahren 1996-1998, gesammelt wurden und als repräsentativ für Hausstaubproben aus Haushalten der Bundesrepublik Deutschland gelten.

Die Sammlung der weiteren Hausstaubproben erfolgte von Februar 2007 bis März 2009 in Zusammenarbeit mit der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg über Informationsblätter, die in Zusammenarbeit mit der Verbraucherzentrale NRW erstellt und an interessierte Bürger verschickt wurden. Durch weitere Öffentlichkeitsmaßnahmen (div. Zeitungsartikel und wissenschaftliche Tagungsbeiträge) wurden insgesamt 372 Proben zusammen mit einem Fragebogen gesammelt. Die 354 Hausstaub- und 18 Baustoffproben stammten aus 343 Haushalten (Toepfer et al. 2010). 153 Hausstaubproben konnten anhand des Fragebogens als Schadensfälle im Sinne eines sichtbaren Schimmelpilzbefalles im Wohnraum bezeichnet werden („Schadensfallproben“). Zusätzlich wurden 201 Kontrollproben aus Wohnungen ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum gesammelt („Kontrollproben“).

Die Herkunftsorte der Proben sind der Abbildung 20 zu entnehmen. Der überwiegende Teil der Proben stammte aus Nordrhein-Westfalen und der Region um Oldenburg.

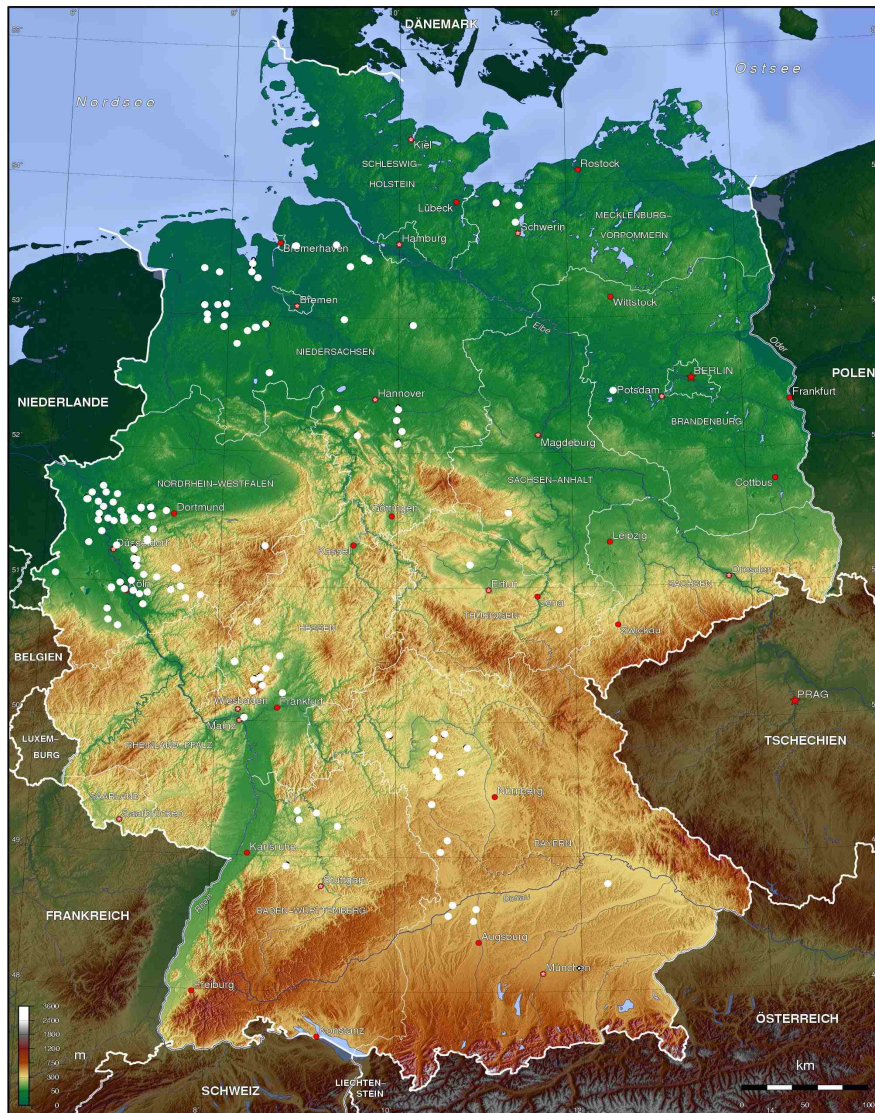


Abbildung 20: Jeder weiße Punkt in der Übersichtskarte (Schwimmer 2011) markiert einen Postleitzahlenbezirk in der Bundesrepublik Deutschland aus dem eine oder auch mehrere Proben stammen. Jeweils eine weitere Probe stammt aus Belgien, Österreich und Spanien.

### 3.3.2 Probennahme

Die Probennahme erfolgte durch die Bewohner selbst mit der normalen Staubsaugerreinigung der Räume nach den Empfehlungen der Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI- und DIN- Normenausschuss (VDI-RICHTLINIEN 2001). Hierbei wurde beachtet, dass der Staubsaugerbeutel mindestens halb gefüllt sein musste, um eine repräsentative Probe zu erhalten. Ohne die Filterwirkung des gesammelten Staubes ist die Rückhaltung der Feinstaubfraktion  $< 10 \mu\text{m}$  nicht hoch genug (Berger-Preiss et al. 1997).

Zur Homogenisierung der Proben wurde der gesamte Staubsaugerbeutelinhalt in Anlehnung an DIN 66165-2 (DIN 1987b) und VDI 4300-8 (VDI-RICHTLINIEN 2008) von Hand gesiebt (Butte und Heinzow 2002). Die Siebung erfolgt in zwei Schritten, zuerst mit einem 2 mm und anschließend mit einem 63  $\mu\text{m}$  Sieb. Abbildung 21 zeigt die Probenvorbereitung im Labor. Die Hausstaubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$  wurde als Probenmaterial eingesetzt und bei Raumtemperatur, dunkel und trocken, in braunen Weithalsglasflaschen aufbewahrt.



Abbildung 21: Ansicht typischer Inhaltsstoffe im Staubsaugerbeutel und in gesiebten Hausstaubfraktionen

Für die Validierung einiger Methoden wurde aus 171 Kontrollproben ein Poolstaub hergestellt. Dafür wurden je  $3,0 \pm 0,4 \text{ g}$  abgewogen, gemischt und 2 Stunden durch Rotation in einem 2000 mL Igelkolben homogenisiert.

### 3.3.3 Fragebogen

Für alle gemeinsam mit der Universität Oldenburg (Toepfer 2010) gesammelten Proben wurde ein Fragebogen in Anlehnung an die Protokolle aus der VDI-Richtlinie 4300 Blatt 10 (VDI-RICHTLINIEN 2008) und dem Schimmelpilzleitfaden des Umweltbundesamtes (Moriske und Szewzyk 2002) sowie nach Angaben aus der Literatur erhoben (Keller et al. 2004). Hier wurden Informationen über die Lage, die Eigenschaften, die Ausstattung und Belegung der Wohnungen/Gebäude, das Nutzerverhalten der Bewohner und das Vorkommen von Schimmelpilzbefall ermittelt (s. Anhang Tabelle 50).

Ein Großteil der Teilnehmer der Studie füllte den Fragebogen selbstständig aus und schickte diesen zusammen mit den Staubsaugerbeuteln ein. Bei Haushalten aus dem Großraum Oldenburg oder Duisburg wurden die Proben direkt bei den Teilneh-

mern abgeholt und der Fragebogen gemeinsam ausgefüllt. Die Befragung diente zur Ermittlung von möglichen Einflüssen auf den Schimmelpilz- und Mykotoxingehalt im Hausstaub (Toepfer 2010, Toepfer et al. 2010).

### **3.3.4 Extraktion**

Aufgrund der unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der ausgewählten Mykotoxine wurde nach Vorversuchen mit verschiedenen Lösemittelkombinationen ein universelles Extraktionsverfahren entwickelt. Hierbei wurden 0,5 g Probenmaterial der Hausstaubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$  für 20 Minuten im Ultraschallbad mit 5 mL eines Gemisches aus Methanol/Wasser (84/16) extrahiert (Portner et al. 2008a). Anschließend wurde die Probe über einen  $0,45 \mu\text{m}$  Spritzenfilter filtriert und bei  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  in braunen Glasgefäßen gelagert.

### **3.3.5 Bestimmung des Wasser- und Glühverlustes**

Zur Bestimmung des organischen Anteils in den gesiebten Staubproben wurde die Trockenmasse, der Glührückstand und der Glühverlust in Anlehnung an DIN 38409 Teil 1 (DIN 1987a) bestimmt.

Für die Bestimmung der Trockenmasse wurden 100 mg gesiebter Staub der  $\leq 63 \mu\text{m}$  Fraktion in einen getrockneten und gewogenen Porzellantiegel gegeben und 1 Stunde bei  $105 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  in getrocknet. Die im Exsikkator erkalteten Tiegel mit Staub wurden auf 1 mg genau gewogen und erneut für 30 Minuten getrocknet. Dieser Vorgang wurde bis zur Gewichtskonstanz wiederholt.

#### **Berechnung der Trockenmasse ( $m_T$ ):**

$m_a$  = Masse der leeren Tiegel [g]

$m_b$  = Masse der Schale mit der Trockenmasse [g]

$m_T$  = Trockenmasse [g]

$\Rightarrow m_T = m_b - m_a$  (Formel 1)

**Berechnung des Wasserverlusts (WV):** $m_d$  = Masse der Tiegel mit frischem Staub [g] $m_{WV}$  = Wasserverlust [g]

$$\Rightarrow m_{WV} = m_d - m_b \quad (\text{Formel 2})$$

$$WV = \frac{m_{WV}}{m_T} \cdot 100[\%] \quad (\text{Formel 3})$$

Für die Bestimmung des Glührückstands und Glühverlust wurden die Tiegel mit dem getrockneten Staub innerhalb von 5 Stunden auf 550 °C erhitzt und dann 60 Minuten geglüht. Die im Exsikkator erkalteten Tiegel wurden auf 1 mg genau gewogen und erneut für 60 Minuten geglüht. Dieser Vorgang wurde bis zur Gewichtskonstanz wiederholt.

**Berechnung des Glührückstands ( $m_G$ ):** $m_c$  = Masse der Tiegel mit Glührückstand [g] $m_G$  = Glührückstand [g]

$$\Rightarrow m_G = m_c - m_a \quad (\text{Formel 4})$$

**Berechnung Glührückstand ( $\beta_{GG}$ ):**

$$\beta_{GG} = \frac{m_G}{m_T} \cdot 100[\%] \quad (\text{Formel 5})$$

**Berechnung Glühverlust ( $\beta_{GV}$ ):**

$$\beta_{GV} = 100 - \beta_{GG} [\%] \quad (\text{Formel 6})$$

### **3.4 Entwicklung und Anwendung von Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen beim Fehlen von Referenzsubstanzen am Beispiel von *Stachybotrys chartarum***

Die vom Schimmelpilz *Stachybotrys chartarum* gebildeten Mykotoxine wie z.B. Satratoxin G, Satratoxin H oder Roridin L-2 sind als Referenzsubstanzen nicht erhältlich. Deshalb wurden für die Entwicklung von Nachweismethoden verschiedene Wildstammisolate im Labor kultiviert und extrahiert.

Zur Überprüfung ob die ausgewählten Wildstammisolate Satratoxin und anderen Trichothecene produzieren, wurden im Anschluss an die Kultivierung Vorversuche mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) nach Vorgaben aus der Literatur durchgeführt (Harrach et al. 1981, Jarvis et al. 1986). Die einzelnen Spots auf der DC-Platte wurden ausgestanzt und zusätzlich durch Kopplung von Hochleistungs-dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie (HPTLC-MS) in der Zentralen Analytik der Universität Oldenburg untersucht (Spot-Extraktor: Prototyp des CAMAG TLC-MS Interface; HPLC: Thermo Separation Products SpectraSystems P2000; MS: Finnigan LCQ-Classik mit ESI-Ionenquelle).

Einzelne aus dem Mycel gewonnene Extrakte wurden für die LC-MS Methodenentwicklung eingesetzt (Portner et al. 2009a, Portner et al. 2009b). Diese Messmethoden wurden später an weiteren ausgewählten Stämmen und an Hausstaubproben, sowie Baumaterialien angewendet.

#### **3.4.1 Kultivierung**

Es wurden vier verschiedene Wildisolate von *Stachybotrys chartarum* (S1 - S4) an der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg in Anlehnung an die Methode von Jarvis et al. (1998) kultiviert. Als Nährmedium wurden Kartoffelpüree (200 g/L) und Instantreisflocken (250 g/L) versetzt mit Glucose (18,15 g/L) verwendet. Die Kultivierung dauerte zwei Wochen bei Raumtemperatur (RT) und weitere zwei Wochen bei 5 °C. Diese vier Stämme wurden für die spätere LC-MS Methodenentwicklung eingesetzt. Abbildung 22 zeigt eine mikroskopische Aufnahme von Stamm S1 und eine Abbildung von Samson et al. (2002).



Zur Ermittlung der optimalen Kultivierungsbedingungen für eine maximale Toxinproduktion wurden anschließend Versuche mit S1, S4 sowie weiteren vom Max Rubner Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie in Kulmbach zur Verfügung gestellten Stämmen (S1114, S1495, S1624) (Höhne 2008, Gareis und Höhne 2009, Schwan 2009) vorgenommen. Die *Stachybotrys chartarum* Stämme wurden für drei Wochen bei Raumtemperatur auf Kartoffelpüree-medium (KP) (53 g/L) versetzt mit Saccharose (8 g/L) und Instantreisflockenmedium (IRF) (80 g/L) versetzt mit Saccharose 14 g/L inkubiert. Danach wurde eine Hälfte der Anzucht bei 4 °C und die andere Hälfte für maximal drei weitere Wochen bei Raumtemperatur bebrütet. An diesen wurden die entwickelten LC-MS Messmethoden zum Nachweis der Toxinbildung angewendet.

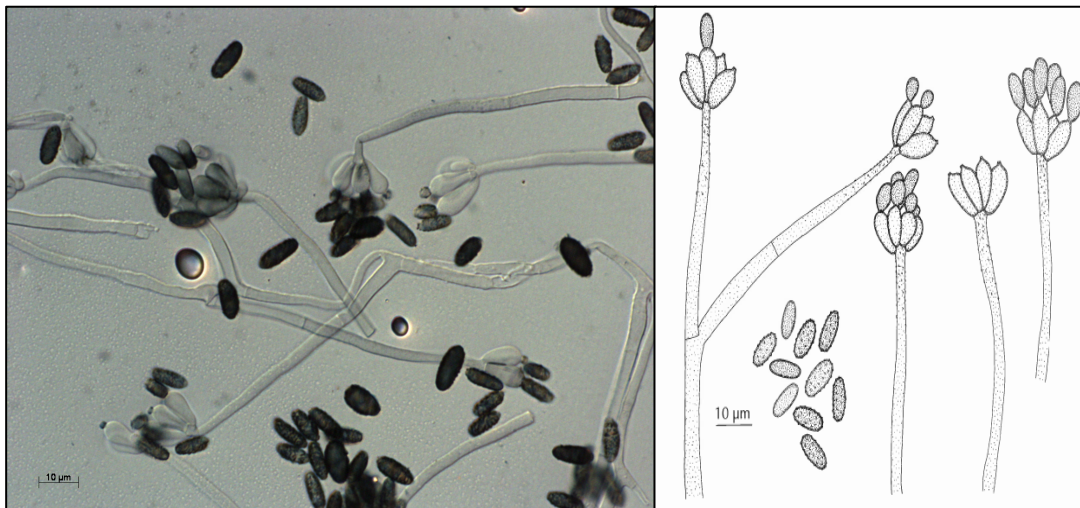


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahme von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1 (links) und Literaturvergleich (rechts, Samson et al. 2002)

### 3.4.2 Extraktion

Die für die Entwicklung und Optimierung der LC-MS-Messmethoden eingesetzten Stämme S1 - S4 wurden in Anlehnung an die Methode von Hinkley und Jarvis extrahiert (Hinkley und Jarvis 2001). Hierfür wurde das Mycel vom Nährmedium gelöst, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend zerkleinert. 5 g der Probe wurden eingewogen und mit 30 mL eines Chloroform-Methanol-Gemisches im Verhältnis 1:1 für 1 Stunde im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wurde über Nacht im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Es folgte eine Vakuumfiltration über einen 1 µm Glasfaser-

filter, danach wurden die Proben am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 337 mbar über einen Zeitraum von einer Stunde eingengt. Das verbliebene zähflüssige, braune Extrakt wurde anschließend in 5 mL Methanol resuspendiert und im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Im Anschluss wurden die Toxine mithilfe einer Festphasenextraktion isoliert. Hierzu wurden 2 g einer Polyethylenimid-Festphase (PEI) verwendet. Der Methanolextrakt wurde in einem ersten Schritt unter Stickstoffzufuhr bei 50 °C eingedampft und dann in 0,5 mL Dichloromethan aufgenommen. Die mit PEI befüllten 6 mL Glassäulen wurden mit 10 mL Dichloromethan konditioniert. Anschließend wurden die 0,5 mL Extrakt auf die Säule gegeben und zunächst mit 15 mL Dichloromethan eluiert (Fraktion I). In einem weiteren Schritt wurde dann mit 15 mL Methanol eluiert (Fraktion II). In Fraktion I befinden sich Atranone und makrozyklische Trichothecene, in Fraktion II liegen die spirozyklische Drimane vor. Für die HPLC-MS Analyse wurde die erste Fraktion erneut unter Stickstoffstrom eingedampft und in 15 mL Methanol gelöst. Alle Proben wurden über einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porenweite filtriert und bis zur Messung im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Die Fraktionen I und II der Stämme S1 bis S4 wurden für die Methodenentwicklungen verwendet.

Für die Evaluierung der optimalen Kultivierungsbedingungen für eine maximale Toxinproduktion mit den Stämmen S1, S4, S1114, S1495 und S1624 wurden die Proben abweichend von dem zuvor beschriebenen Verfahren extrahiert. Hier wurde das Mycel zusammen mit dem Nährmedium extrahiert. Je Gramm Probe wurde 6 mL eines 1:1 Gemisches von Methanol und Chloroform zugegeben und für eine Stunde im Ultraschallbad behandelt. Die Suspension wurde über Nacht bei 5 °C gelagert und danach mittels eines Glasfaserfilters filtriert. Anschließend wurden die Proben mittels Rotationsverdampfung bei 40 °C durch schrittweise Erniedrigung des Druckes auf 40 mbar bis zur Trockene eingengt. Die braunen Rückstände wurden mit 25 mL Methanol gelöst und bei 40 °C unter Stickstoff eingedampft. Der Trockenrückstand wurde mit 15 mL Methanol aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurden die Proben über einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porenweite filtriert und bis zur Messung im Kühlschrank bei 5 °C gelagert.

### **3.5 LC-MS Messmethoden**

Für den Nachweis von Mykotoxinen in den extrahierten Feststoffproben wurden verschiedene Messmethoden durch Kombination von flüssigkeitschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion entwickelt und angewandt. Die Durchführung und Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software der Gerätehersteller in Anlehnung an anerkannte Regeln der Laborpraxis (DIN 1986). Es wurden nur Peaks mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N)  $\geq 3$  ausgewertet und nicht geglättet. Zur Erstellung der Kalibration für die Quantifizierung wurde eine lineare Regression verwendet.

Für die Messmethoden zur Quantifizierung wurden die Einstellungen des Massenspektrometers anhand von Vorversuchen durch Injektion von Einzelstofflösungen mittels Spritzenpumpe ausgewählt und optimiert. Die Auswahl der Ionisierungstechnik und die Optimierung der Parameter der Ionenquelle wurden anschließend durch Fließinjektionsanalyse mittels HPLC ermittelt. Die Auswahl der MRM-Übergänge bei den MS/MS Messmethoden für die Analyten erfolgte unter chromatographischen Bedingungen anhand des S/N.

#### **3.5.1 Quantifizierung mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie**

Die Mykotoxine Aflatoxin B1, Citrinin, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin wurden in den extrahierten Hausstaub- und Baustoffproben quantifiziert. Ausgewählte Mykotoxine von *Stachybotrys chartarum* wurden in den Proben qualitativ analysiert. Durch Übertragung des spezifischen Fragmentierungsmuster von Roridin L-2, Satratoxin G, Isosatratoxin G, Satratoxin H, Isosatratoxin H, sowie Trichoverrin A und B nach der in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Methodik, wurden diese Analyten der MRM-Messmethode zur Quantifizierung hinzugefügt. Die Analyse wurde mittels Flüssigkeitschromatographie-tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS) mit positiver und negativer Elektrosprayionisierung im MRM-Messmodus durchgeführt (HPLC: Shimadzu Prominence LC-20; MS: AB Sciex 3200 QTrap) (Portner et al. 2008a). Die optimierten Parameter für die Chromatographie sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Chromatographische Parameter der Mykotoxinmultimethode

Parameter	Optimierte Einstellungen
Eluenten	A: 1 L entmineralisiertes Wasser, versetzt mit 2 mmol Ammoniumacetat und mit Essigsäure auf pH 3,0 eingestellt B: Methanol
Säule	Varian Pursuit XRs C18, 5 µm, 150 x 2 mm
Vorsäule	Phenomenex Security Guard C18 4 x 2 mm
Säulentemperatur	40 °C
Flussrate	300 µL/min
Injektionsvolumen	20 µL

Um den polarsten Analyten erst nach der doppelten Systemsdurchflusszeit und gleichzeitig alle Zielanalyten innerhalb von 10 Minuten von der Trennsäule zu eluieren, wurden die Gradientenverläufe des Lösemittels auf Grundlage von Basismessungen mit Hilfe der Software Drylab (Molnar 2002) optimiert. Der Lösemittelgradient für die positive Ionisierung ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 23).

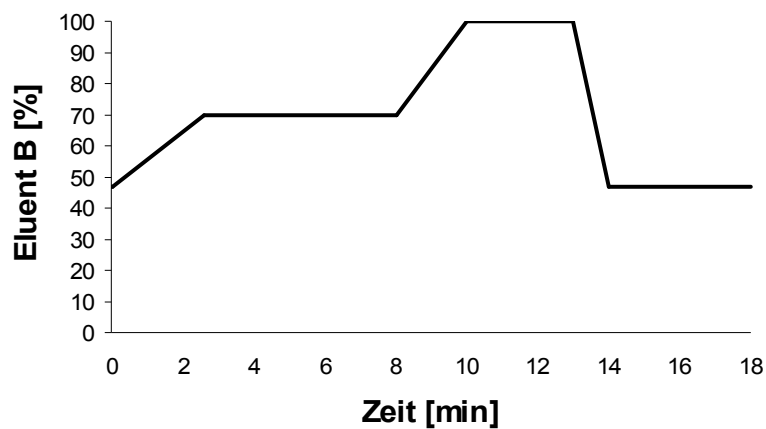


Abbildung 23: Anteil des organischen Eluenten (B) bei positiver Ionisierung

Der Lösemittelgradient für die negative Ionisierung ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 24). Tabelle 16 fasst die MS-Parameter zusammen.

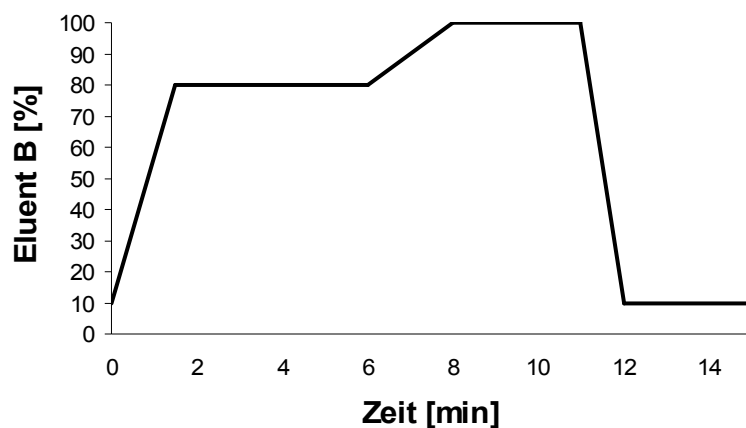


Abbildung 24 Anteil des organischen Eluenten (B) bei negativer Ionisierung

Tabelle 16: Optimierte MS-Parameter bei positiver und negativer Ionisierung

Parameter	Optimierte	Optimierte
	Einstellungen	Einstellungen
	ESI-positiv	ESI-negativ
Quellentemperatur	575 °C	500 °C
Vorhanggas	10 psi	10 psi
Kollisionsgasdruck	medium	medium
Ionenquellengas 1	30 psi	30 psi
Ionenquellengas 2	70 psi	80 psi
Ionisierungsspannung	5.000 V	-4.200 V
Verweilzeit zur Quantifizierung im Multiple-Reaction-Monitoring-Modus (MRM)	60 ms	120 ms
Suchlaufbereich EMS	100 -750 <i>m/z</i>	100 -750 <i>m/z</i>
Suchlaufgeschwindigkeit EMS	1000 Da/s	1000 Da/s

Für die Messmethode mit positiver Elektrosprayionisierung sind die Parameter in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tabelle 17). Die Messungen erfolgten im MRM-Modus und wurden in Anlehnung an Literaturvorgaben (EU-Kommission 2002) durchgeführt und ausgewertet. Die Massenübergänge wurden einzeln anhand der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse ausgewählt.

Tabelle 17: Optimierte MS-Parameter zur Quantifizierung (Fett) und zur Qualifizierung bei positiver Ionisierung (Entclusteringpotential [DP], Eingangspotential [EP], Kollisionszelleneingangspotential [CEP], Kollisionsenergie [CE], Kollisionszellenausgangspotential [CXP])

Mykotoxin	Vorläufer- ion Q1 [m/z]	Art Vor- läuferion Q1	Produktion Q3 [m/z]	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [eV]	CXP [V]
<b>Aflatoxin B1</b>	<b>313</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>128</b>	<b>61</b>	<b>3</b>	<b>16</b>	<b>89</b>	<b>4</b>
Aflatoxin B1	313	[M+H] <sup>+</sup>	285	61	3	16	33	4
<b>Diacetoxyscirpenol</b>	<b>384</b>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	<b>105</b>	<b>21</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>43</b>	<b>4</b>
Diacetoxyscirpenol	384	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	141	21	8	16	75	4
<b>Ochratoxin A</b>	<b>404</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>102</b>	<b>31</b>	<b>8</b>	<b>20</b>	<b>89</b>	<b>4</b>
Ochratoxin A	404	[M+H] <sup>+</sup>	239	31	8	20	31	4
<b>Sterigmatocystin</b>	<b>325</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>115</b>	<b>61</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>87</b>	<b>4</b>
Sterigmatocystin	325	[M+H] <sup>+</sup>	281	61	3	14	49	4
<b>Gliotoxin</b>	<b>327</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>245</b>	<b>21</b>	<b>3,5</b>	<b>18</b>	<b>25</b>	<b>4</b>
Gliotoxin	327	[M+H] <sup>+</sup>	263	21	3,5	18	17	4
<b>Roridin A</b>	<b>550</b>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	<b>249</b>	<b>26</b>	<b>6,5</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>4</b>
Roridin A	550	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	85	26	6,5	24	47	4
Roridin L-2	531	[M+H] <sup>+</sup>	249	26	6,5	24	25	4
Roridin L-2	531	[M+H] <sup>+</sup>	231	26	6,5	24	25	4
Satratoxin G / Iso- satratoxin G	545	[M+H] <sup>+</sup>	249	26	6,5	24	25	4
Satratoxin G / Iso- satratoxin G	545	[M+H] <sup>+</sup>	231	26	6,5	24	25	4
Satratoxin H / Iso- satratoxin H	529	[M+H] <sup>+</sup>	249	26	6,5	24	25	4
Satratoxin H / Iso- satratoxin H	529	[M+H] <sup>+</sup>	213	26	6,5	24	25	4
Trichoverrin A / B	533	[M+H] <sup>+</sup>	249	26	6,5	24	25	4
Trichoverrin A / B	533	[M+H] <sup>+</sup>	231	26	6,5	24	25	4

Für die Messmethode mit negativer Ionisierung sind die Parameter in der folgenden Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Optimierte MS-Parameter zur Quantifizierung (Fett) und Qualifizierung bei negativer Ionisierung

Mykotoxin	Vorläuferion Q1 [m/z]	Art Vor- läuferion Q1	Produktion Q3 [m/z]	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [eV]	CXP [V]
<b>Deoxynivalenol</b>	<b>295</b>	[M-H] <sup>-</sup>	<b>265</b>	<b>-35</b>	<b>-8</b>	<b>-18</b>	<b>-16</b>	<b>-4</b>
Deoxynivalenol	295	[M-H] <sup>-</sup>	138	-35	-8	-18	-22	-2
DON-Addukt	355	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	265	-25	-4.5	-18	-20	-2
<b>Citrinin</b>	<b>249</b>	[M-H] <sup>-</sup>	<b>175</b>	<b>-65</b>	<b>-6,5</b>	<b>-18</b>	<b>-36</b>	<b>-2</b>
Citrinin-Addukt	281	[M+CH <sub>2</sub> OH] <sup>-</sup>	249	-35	-7	-16	-22	0
Citrinin-Addukt	281	[M+CH <sub>2</sub> OH] <sup>-</sup>	205	-35	-7	-16	-30	0

Die Auswertung erfolgte mit der Software Analyst Version 1.5. Aus den Ergebnissen wurden die analytischen Kenndaten Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 (DIN 2008) berechnet. Die Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeit wurden in Anlehnung an Matuczowski et al. (2003) durchgeführt und berechnet. Es wurde eine Dreifachbestimmung an zwei Tagen mit je drei verschiedenen Konzentrationen durch Dotierung der Poolstaubprobe durchgeführt. Die Berechnung der Matrixwiederfindung (ME), der Extraktionswiederfindung (RE) und der Prozesswiederfindung (PE) wurde wie folgt durchgeführt (Matuszewski et al. 2003).

$c_A$  = Konzentration des Analyten in der Standardlösung [ng/mL]

$c_B$  = Konzentration des Analyten in der vor der Messung dotierten Probe [ng/mL]

$c_C$  = Konzentration des Analyten in der vor der Extraktion dotierten Probe [ng/mL]

#### **Berechnung der Matrixwiederfindung (ME):**

$$ME = \frac{c_B}{c_A} \cdot 100[\%] \quad (\text{Formel 7})$$

#### **Berechnung der Extraktionswiederfindung (RE):**

$$RE = \frac{c_C}{c_B} \cdot 100[\%] \quad (\text{Formel 8})$$

#### **Berechnung der Prozesswiederfindung (PE):**

$$PE = \frac{c_C}{c_A} \cdot 100[\%] \quad (\text{Formel 9})$$

### 3.5.2 Quantifizierung mittels HPLC-Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie

Für die Mykotoxine Aflatoxin B1, Citrinin, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin wurden die Nachweisempfindlichkeit durch Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie (HPLC-QTOF-MS) mit positiver Elektrosprayionisierung (HPLC: Agilent 1200; MS: Bruker maxis) bestimmt. Die optimierten Parameter für die Chromatographie sind in Tabelle 19, die für das Massenspektrometer in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 19: Optimierte chromatographische Parameter

Parameter	Optimierte Einstellungen
Eluenten	A: 1 L entmineralisiertes Wasser, versetzt mit 2 mmol Ammoniumacetat und mit Essigsäure auf pH 3,0 eingestellt B: Methanol
Säule	Varian Pursuit XRs C18, 5 µm, 150 x 2 mm
Vorsäule	Phenomenex Security Guard C18 4 x 2 mm
Lösemittelgradient	5-100 % B in 20 min
Säulentemperatur	40 °C
Flussrate	300 µL/min
Injektionsvolumen	20 µL

Tabelle 20: Optimierte MS-Parameter

Parameter	Optimierte Einstellungen
Quellentemperatur	200 °C
Ionisierungsmodus	positiv
Ionisierungsspannung	4500 V
Zerstäubungsdruck	2,1 bar
Suchlaufbereich	50-1.000 m/z
Aufnahmerate	2 Spektren/s

### 3.5.3 Screening mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie

Der qualitative Nachweis von Mykotoxinen des Schimmelpilzes *Stachybotrys chartarum* anhand der bestimmten Vorläuferionen und des Fragmentierungsmuster wurde



mittels Flüssigkeitschromatographie-Hybridmassenspektrometrie (HPLC-MS und MS<sup>n</sup>) mit positiver Elektrosprayionisierung durchgeführt (HPLC: Shimadzu Prominence LC-20; MS: AB Sciex 3200 QTrap) (Portner et al. 2009a, Portner et al. 2009b). Die chromatographische Trennung erfolgte in Anlehnung an die HPLC-UV Methode von Hinkley und Jarvis (2001). Die massenspektrometrische Detektion erfolgte durch Kombination eines Suchlaufes auf Basis eines Totalionenchromatogramms (EMS) und einer automatischen, informationsabhängigen (Information Depended Acquisition [IDA]) Generierung von Produktionenspektren (EPI) der im jeweiligen Messzyklus intensivsten Vorläuferionen. Details zur Methode sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 21: Optimierte chromatographische Parameter für die HPLC-MS-Screeningmethode

Parameter	Optimierte Einstellungen
Eluenten	A: 1 L entmineralisiertes Wasser, versetzt mit 0,1 % Ameisensäure B: 1 L Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
Lösemittelgradient	5-100 % B in 20 min
Säule	Phenomenex Luna C18, 3 µm, 150 x 2 mm
Vorsäule	Phenomenex Security Guard C18, 4 x 2 mm
Säulentemperatur	40 °C
Flussrate	200 µL/min
Injektionsvolumen	10 µL

Tabelle 22: Optimierte MS-Parameter

Parameter	Optimierte Einstellungen
Quellentemperatur	500°C
Vorhanggas	10 psi
Kollisionsgasdruck	6 psi
Ionenquellengas 1	70 psi
Ionenquellengas 2	60 psi
Ionisierungsmodus	positiv
Ionisierungsspannung	5.500 V
Suchlaufbereich EMS	100-700 <i>m/z</i>
Suchlaufgeschwindigkeit EMS	4.000 Da/s
Suchlaufbereich EPI	50-600 <i>m/z</i>
Suchlaufgeschwindigkeit EPI	4.000 Da/s
Kollisionsenergie (EPI)	30 eV ± 15 eV

### 3.5.4 Screening mittels Kapillar-HPLC-Flugzeitmassenspektrometrie

Der qualitative Nachweis von Mykotoxinen des Schimmelpilzes *Stachybotrys chartarum* anhand der Bestimmung der Summenformeln der Analyten wurde durch Kopplung von Kapillarflüssigkeitschromatographie und Flugzeitmassenspektrometrie (Cap-HPLC-TOF-MS) mit positiver Elektrosprayionisierung durchgeführt (HPLC: Eksigent Express LC-100; Säulenofen:  $\mu$ -mass mini; MS: Leco Unique HT mit Low Flow ESI Ion source) (Portner et al. 2009a, Portner et al. 2009b). Die optimierten Parameter für die Chromatographie sind in Tabelle 23, die für das Flugzeitmassenspektrometer in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 23: Optimierte chromatographische Parameter für die Screeningmethode

Parameter	Optimierte Einstellungen
Eluenten	A: 1 L entmineralisiertes Wasser, versetzt mit 0,1 % Ameisensäure B: 1 L Methanol, versetzt mit 0,1 % Ameisensäure
Lösemittelgradient	5-100 % B in 20 min
Säule	Phenomenex Synergi Fusion-RP, 2,5 $\mu$ m, 100 x 0,3 mm
Säulentemperatur	40 °C
Flussrate	3 $\mu$ L/min
Injektionsvolumen	20 nL

Tabelle 24: Optimierte MS-Parameter

Parameter	Optimierte Einstellungen
Quellentemperatur	100 °C
Ionisierungsmodus	positiv
Ionisierungsspannung	3300 V
Zerstäuberspannung	130 V
Skimmerspannung	57 V
Suchlaufbereich	40-1.000 $m/z$
Aufnahmerate	8 Spektren/s
Emitter	New Objective Taper Tip, 20 cm Innendurchmesser 20 $\mu$ m, Standardbeschichtung

### 3.5.5 Screening mittels HPLC-Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie

Mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie und Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie (HPLC-QTOF-MS) mit positiver Elektrosprayionisierung wurden die Mykotoxine des Schimmelpilzes *Stachybotrys chartarum* anhand der Bestimmung der Summenformeln und des Fragmentierungsmuster in den Proben analysiert (HPLC: Agilent 1200; MS: Bruker maxis) (Portner et al. 2009a, Portner et al. 2009b). Die optimierten Parameter für die Chromatographie sind in Tabelle 25 und für das Massenspektrometer in Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 25: Optimierte chromatographische Parameter

Parameter	Optimierte Einstellungen
Eluenten	A: 1 L entmineralisiertes Wasser + Methanol (9+1), versetzt mit 120 µL Ameisensäure und 10 mmol/L Ammoniumformiat B: 1 L Methanol + entmineralisiertes Wasser (9+1), versetzt mit 120 µL Ameisensäure und 10 mmol/L Ammoniumformiat
Lösemittelgradient	5-100 % B in 10 min
Säule	Phenomenex Luna, 2,5 µm, 50 x 2 mm
Vorsäule	YMC Pro C18, 3 µm, 10 x 2 mm
Lösemittelgradient	10-95 % B in 8 min
Säulentemperatur	40 °C
Flussrate	800 µL/min
Injektionsvolumen	10 µL

Tabelle 26: Optimierte MS-Parameter

Parameter	Optimierte Einstellungen
Quellentemperatur	200 °C
Ionisierungsmodus	positiv
Ionisierungsspannung	4.000 V
Zerstäubungsdruck	1,5 bar
Suchlaufbereich	55-800 <i>m/z</i>
Aufnahmerate	2 Spektren/s

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Optimierung der LC-MS Messmethoden

Für den Nachweis der acht zur Quantifizierung in Hausstaub und Baumaterialien ausgewählten Mykotoxine Aflatoxin B<sub>1</sub>, Citrinin, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin wurden die chromatographischen Trennmethode und die massenselektive Detektion optimiert. Exemplarisch sind an folgenden Beispielen die verschiedenen Ergebnisse der Optimierungen der Messmethoden dargestellt.

#### 4.1.1 Auswahl der spezifischen MRM-Übergänge

Die zur Quantifizierung mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie verwendete Methode ist in Kapitel 3.5.1 beschrieben und wurde hinsichtlich der ausgewählten Massenübergänge optimiert. In Abbildung 25 ist beispielhaft ein Chromatogramm für eine Standardlösung von 100 ng/mL Deoxynivalenol vor der manuellen Optimierung dargestellt. Vom Vorläuferion (Q1) 355  $m/z$   $[M+CH_3COO]^-$  wurden drei Produktionen (Q3) gemessen und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bestimmt. Beim Massenübergang 355–295  $m/z$  ergab sich ein S/N von 17,2, während für den Massenübergang 355–59  $m/z$  ein S/N von 31,2 bestimmt wurde. Der Übergang mit der höchsten Empfindlichkeit (355–265  $m/z$ ) hatte ein S/N von 53,5.

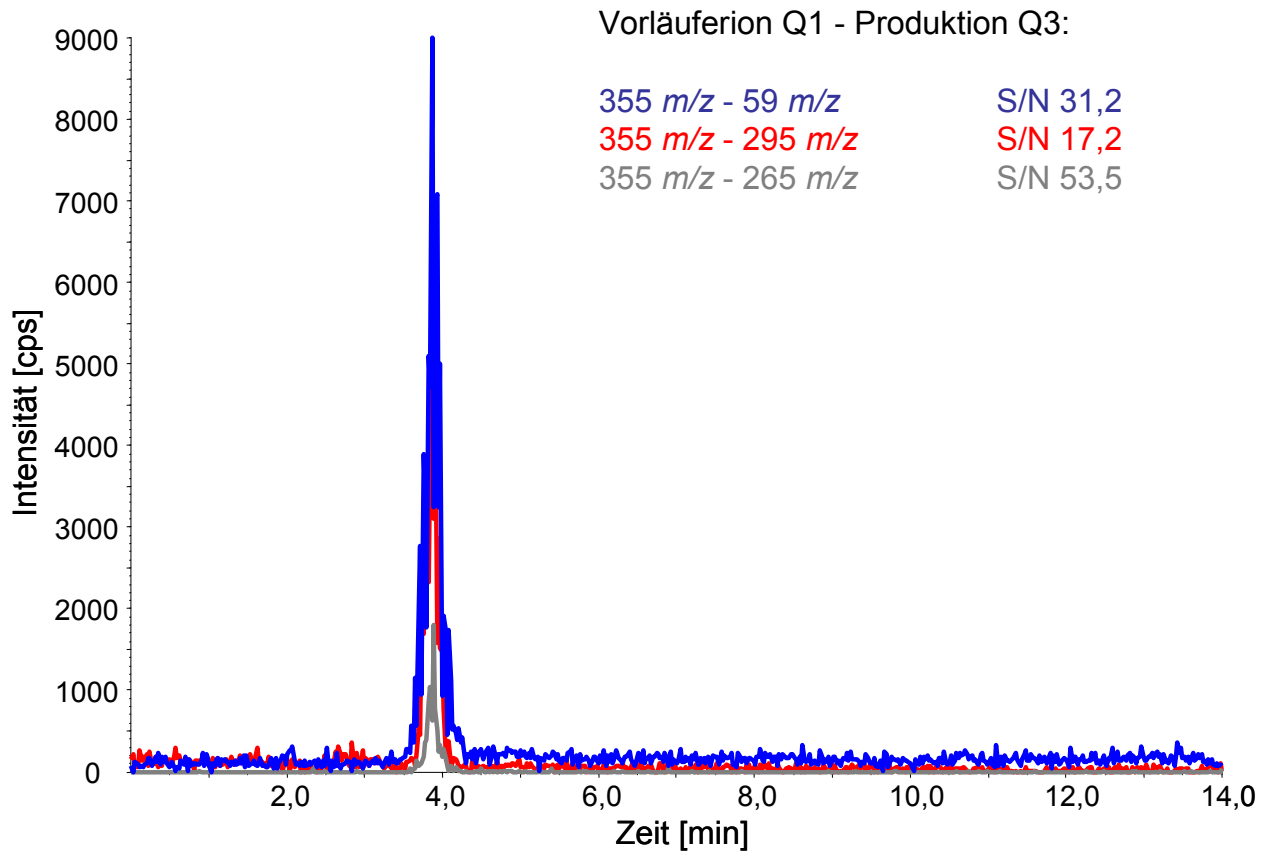


Abbildung 25: MRM-Chromatogramm für eine Standardlösung von Deoxynivalenol mit 100 ng/mL

Abbildung 26 zeigt beispielhaft ein Chromatogramm für eine Standardlösung von 100 ng/mL Deoxynivalenol nach der manuellen Methodenoptimierung. Es wurden zwei Massenübergänge für das deprotonierte Vorläuferion von Deoxynivalenol von 295–265 und 138  $m/z$  gemessen. Die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse betragen 188,5 und 296,5. Für den Massenübergang des Acetatadduktes als Vorläuferion (Q1, 355  $m/z$ ) zum Produktion (Q3) 265  $m/z$  wurde ein S/N von 772,5 bestimmt.

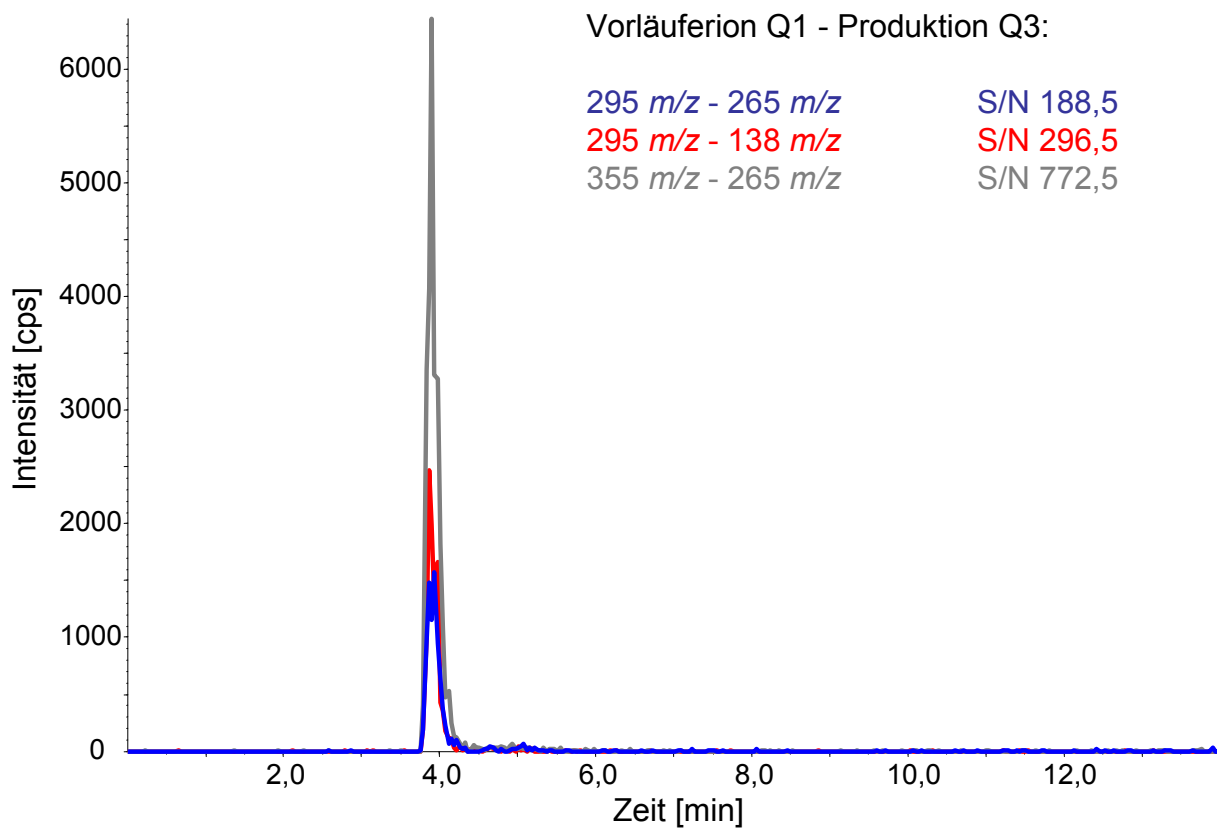


Abbildung 26:MRM-Chromatogramm für eine Standardlösung von Deoxynivalenol mit 100 ng/mL für die optimierte Messmethode

#### 4.1.2 Selektivität/ Spezifität

Nachfolgend ist ein Beispiel für die Optimierung der Selektivität und der Spezifität der verschiedenen Messmodi des verwendeten HPLC-Hybridmassenspektrometers dargestellt. Das Totalionenchromatogramm mit den sechs im ESI-positiv Modus ionisierbaren Mykotoxinen (Aflatoxin B1, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin) eines mit jeweils 40 ng/mL dotierten Extraktes der Poolstaubprobe ist in Abbildung 27 dargestellt. Eindeutige Messsignale mit einem ausreichenden Signal-zu-Rausch-Verhältnis sind nicht zu erkennen.

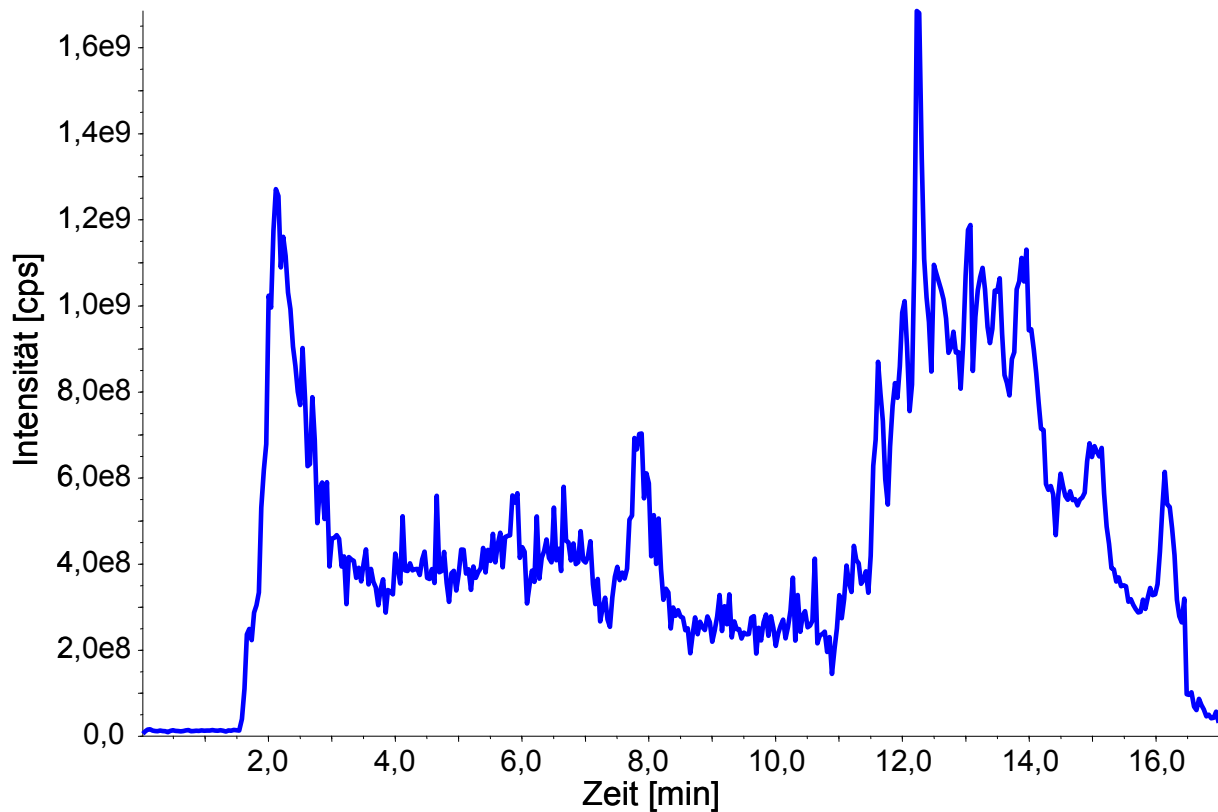


Abbildung 27: Totalionenchromatogramm der sechs im ESI-positiv Modus ionisierbaren Mykotoxine eines mit jeweils 40 ng/mL dotierten Poolstaubprobeextraktes

In Abbildung 28 ist beispielhaft das extrahierte EMS-Chromatogramm für die Massenspur 313  $m/z$  dargestellt. Es sind zwei Peaks bei 6,53 und 12,25 Minuten zu erkennen. Zu der Retentionszeit des Aflatoxin B1 Referenzstandards von 4,47 Minuten ist kein Peak für das protonierte Molekülion (313  $m/z$ ) vorhanden. Die Peaks bei 6,53 min und 12,25 min sind anderen im Extrakt des Poolstaubs vorhandenen Komponenten zuzuordnen.

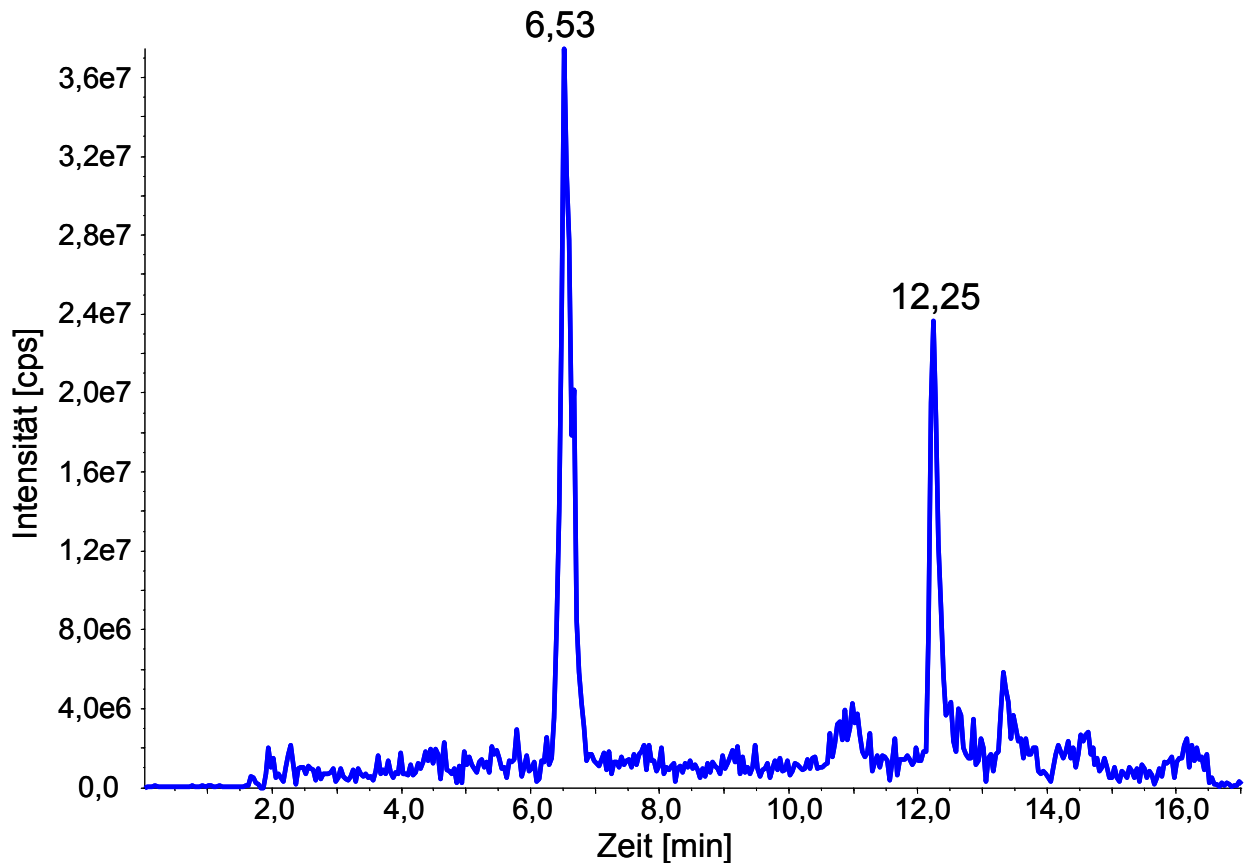


Abbildung 28: Extrahiertes EMS-Chromatogramm für Massenspur des protonierten Vorläuferions von Aflatoxin B1 ( $313\ m/z$ ) in einem mit  $40\ \text{ng/mL}$  dotierten Poolstaubprobeextrakt, Retentionszeit des Referenzstandards  $4,47$  Minuten

Die Abbildung 29 zeigt das MRM-Chromatogramm für die Massenübergänge  $313$  zu  $128$  und  $285\ m/z$  des dotierten Poolstaubprobenextraktes. Dieser Übergang entspricht dem Q1 Vorläuferion und den beiden Q3 Produktionen für den Analyten Aflatoxin B1. Die Retentionszeit von  $4,47$  Minuten und das Verhältnis der beiden Q3 Produktionen zueinander entsprechen dem Aflatoxin B1 Referenzstandard. Zur Retentionszeit von  $6,55$  Minuten ist nur ein Peak für den Massenübergang  $313$  zu  $128\ m/z$  zu erkennen, während für den zweiten Massenübergang der Referenzsubstanz von  $313$  zu  $285\ m/z$  das Signal innerhalb des Rauschens lag.



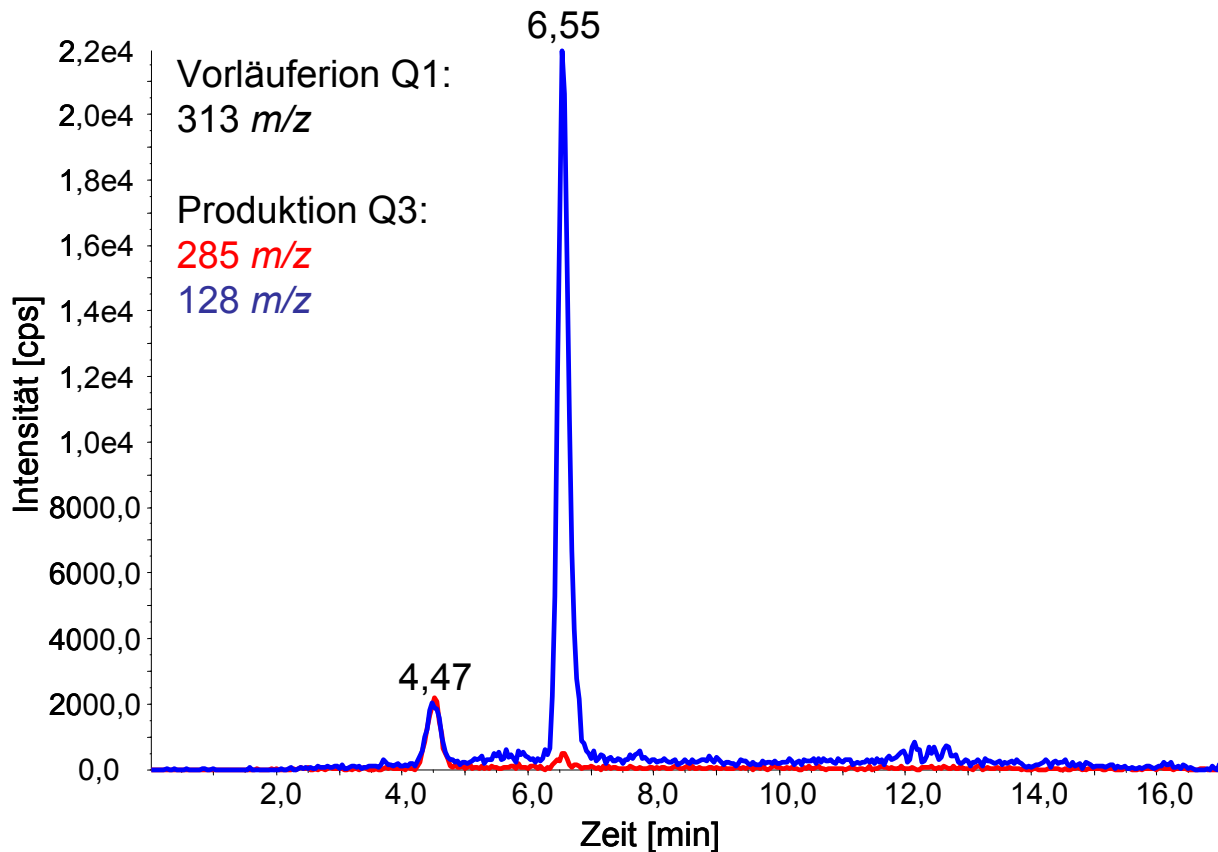


Abbildung 29: MRM-Chromatogramm für die extrahierten Massenübergänge von Aflatoxin B1 in einem mit 40 ng/mL dotierten Poolstaubprobeextrakt, Retentionszeit des Referenzstandards 4,47 Minuten

### 4.1.3 Matrixeffekte

Abbildung 30 zeigt beispielhaft den Einfluss der Probenmatrix auf die Ionisierung in der Ionenquelle. Hierzu wurde ein Poolstaubextrakt mit der in Kapitel 3.5.1 dargestellten HPLC-Hybridmassenspektrometer Messmethode analysiert. Dargestellt sind jeweils beide Massenspuren für die sechs Mykotoxine (Aflatoxin B1, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin), die sich mit positiver Elektrosprayionisierung nachweisen ließen. Die extrahierte Hausstaubprobe wurde über die chromatographische Trennsäule geleitet. Zusätzlich wurde in Anlehnung an die Arbeit von Bonfiglio et al. (1999) in diesen Fluss nach der Trennsäule an der Ionenquelle des Massenspektrometers mit einem T-Stück über eine Spritzenpumpe eine Lösung mit 1  $\mu\text{g/mL}$  der untersuchten Mykotoxine und einer Flussrate von 3  $\mu\text{L/min}$  zugegeben. Bei der Systemdurchflusszeit, d. h. der Zeit von der Probenaufgabe bis zum Erreichen des Detektors, von 1,7 min, nimmt das Messsignal für alle

sechs dargestellten Mykotoxine deutlich ab. Im Retentionszeitfenster der Zielanalyten im Bereich von vier bis acht Minuten ist nur in der blau dargestellten Massenspur für den Analyten Aflatoxin B1 (Q1 313  $m/z$ ; Q3 128  $m/z$ ) bei 6,6 Minuten ein Peak zu erkennen. Dies ist keine Signalverstärkung durch die Matrix, sondern eine Matrixkomponente mit einem ähnlichen Fragmentierungsmuster. Mit Hilfe der HPLC-QTOF-MS wurde hierfür die Summenformel ( $C_{19}H_{21}O_4$ ) mit einer Massengenauigkeit von 3,6 ppm bestimmt. Eine in der Auswertesoftware des Messgerätes integrierte Datenbankrecherche (<http://www.chemspider.com>) schlug den Weichmacher Butylbenzylphthalat vor.

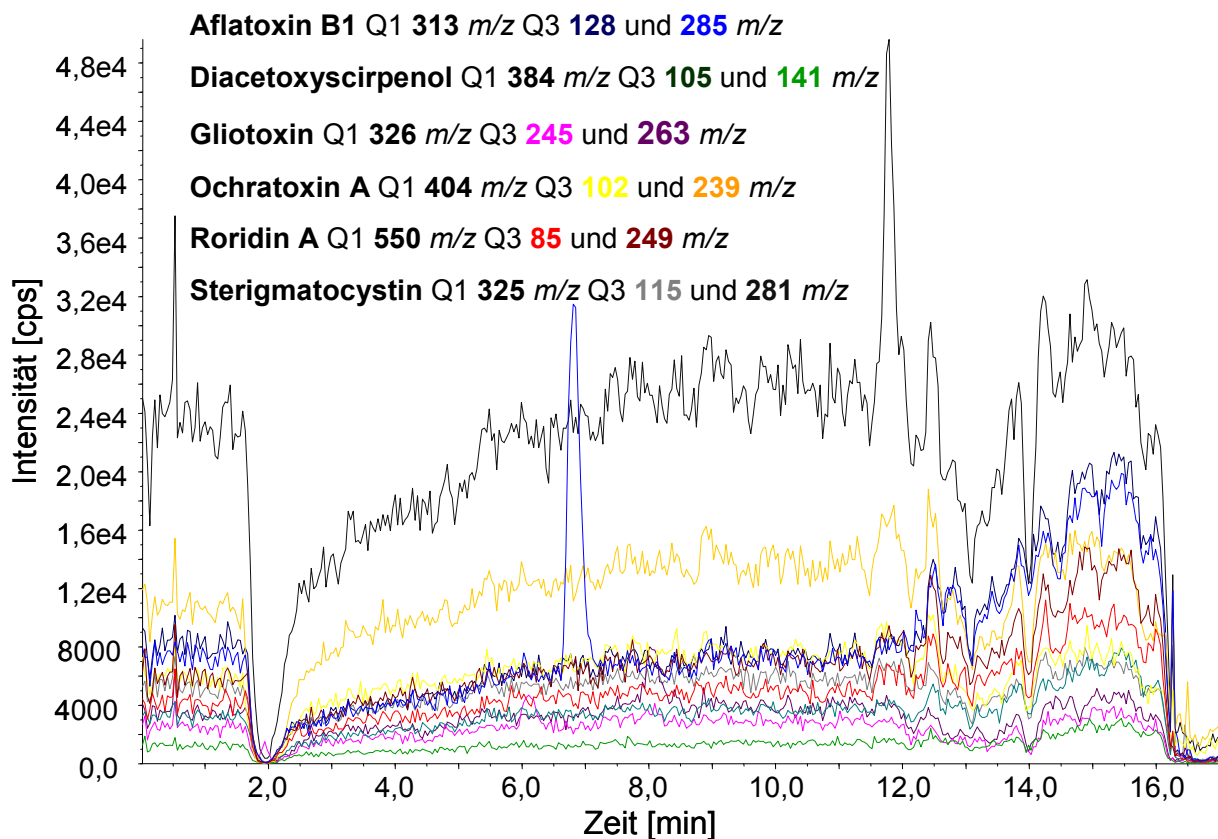


Abbildung 30: MRM-Chromatogramm für die einzelnen Massenspuren der sechs Mykotoxine die sich im positiven Elektrospraymodus ionisieren ließen. Der Poolstaubprobenextrakt wurde über die Trennsäule chromatographiert. Eine Referenzstandardlösung mit 1  $\mu\text{g/mL}$  wurde nach der Trennsäule über ein T-Stück im Verhältnis 1:100 in den Lösemittelfluss aus der HPLC-Anlage gegeben.

#### **4.1.4 Vergleich verschiedener organischer Lösemittel**

In Abbildung 31 ist ein Vergleich von Intensität und Elutionsreihenfolge der ausgewählten Mykotoxine Aflatoxin B1, Citrinin, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin bei Verwendung von verschiedenen organischen Co-Solventien dargestellt (Teutenberg et al. 2008). Diese Experimente wurden mit einer Agilent 1200 Rapid Resolution HPLC, die mit dem Flugzeitmassenspektrometer Unique HT TOFMS der Firma LECO Instrumente GmbH gekoppelt wurde, durchgeführt. Die Parameter der Ionenquelle wurden für die Experimente konstant gehalten. Als Trennsäule wurde eine Agilent Zorbax SB C-18 Säule (5 cm, 3,0 mm ID, 1,8 µm) verwendet. Es wurden lineare Lösungsmittelgradienten von 5 % auf 100 % des organischen Lösemittels in 10 Minuten verwendet und die entsprechenden Chromatogramme aufgezeichnet. Die Säulentemperatur wurde auf 70 °C eingestellt.

Das Gemisch aus Wasser und 2-Propanol besaß hier die höchste Elutionskraft, während beim Einsatz von Methanol die geringste Elutionskraft beobachtet wurde. Am Beispiel von Citrinin zeigte sich, dass die Selektivität stark vom Co-Solvens abhängig war. Citrinin eluierte als letzter Analyt beim Einsatz von Ethanol als Co-Solvens. Mit Aceton, Tetrahydrofuran oder Acetonitril ändert sich die Selektivität und Sterigmatocystin eluierte deutlich später als Citrinin. Ähnliche Phänomene ergaben sich bei den übrigen Analyten. So eluierte Ochratoxin A unter Verwendung von Aceton, Tetrahydrofuran und Ethanol nach Sterigmatocystin, jedoch ist mit 2-Propanol und Acetonitril eine Umkehr der Elutionsreihenfolge zu beobachten gewesen. Für dieses Peakpaar ist die Auflösung allerdings mit Tetrahydrofuran am größten. Ein weiterer wichtiger Effekt bei der Kopplung von HPLC und MS ist die Ionisierungseffizienz der Analyten. Es wurden für verschiedene Solvenssysteme deutliche Unterschiede im Response für einzelne Substanzen beobachtet. Diacetoxyscirpenol wies bei Verwendung von Methanol den höchsten und bei Ethanol den niedrigsten Response auf. Bei der Detektion von Ochratoxin A und Gliotoxin erwies sich ebenfalls Methanol als besonders gut geeignet, wohingegen Sterigmatocystin mit Tetrahydrofuran eine hohe Intensität zeigte.

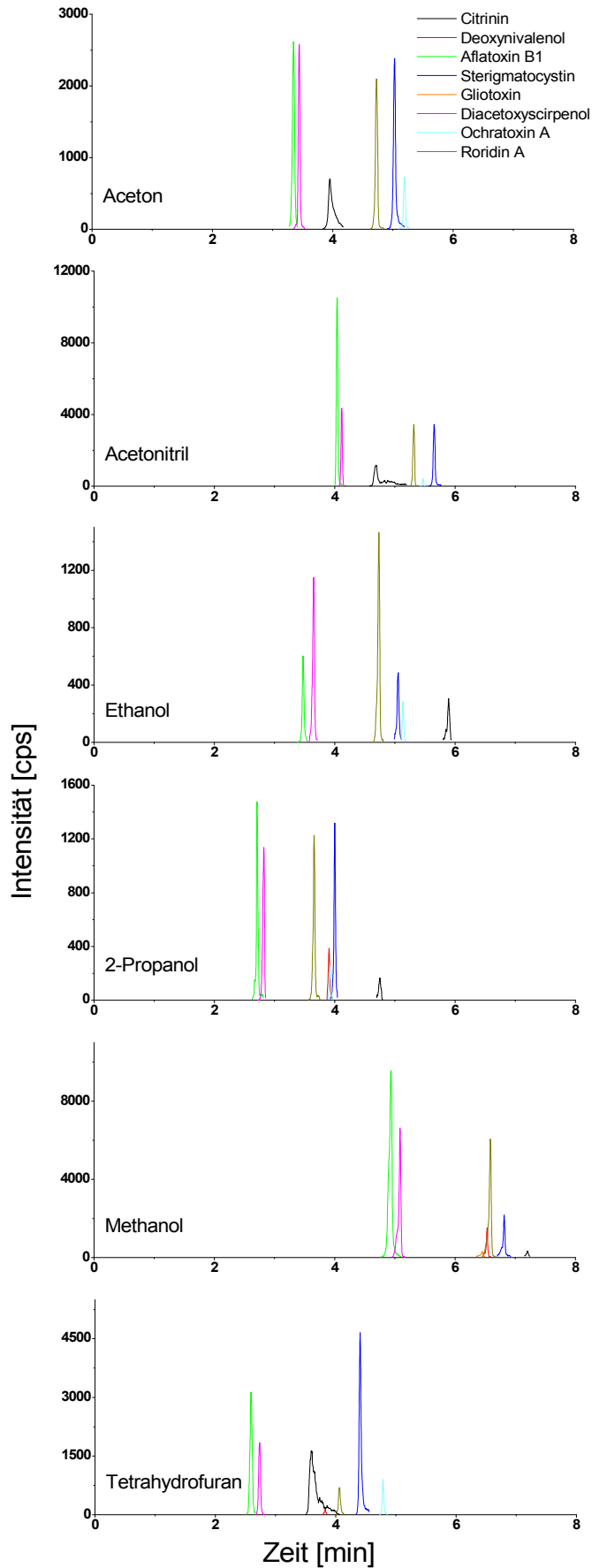


Abbildung 31: Vergleich von Intensitäten und Elutionsreihenfolge von acht Mykotoxinen bei verschiedenen organischen Co-Solventien, (Gradienten des Co-Eluenten von 5% auf 100% ansteigend)

## 4.2 Quantitativer Nachweis von Mykotoxinen

### 4.2.1 Methode zur Quantifizierung mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie

Für den Nachweis der ausgewählten Mykotoxine wurden die extrahierten Hausstaub- und Baustoffproben mit der in 3.5.1 beschriebenen Methode untersucht. Die nachfolgende

Tabelle 27 fasst die analytischen Kenndaten zusammen. Die Berechnung von Nachweis-, Erfassungsgrenzen und Bestimmungsgrenzen erfolgte nach DIN 32645 aus einer sechsfach Bestimmung (DIN 2008). Die dritte Spalte gibt die instrumentellen Nachweisgrenzen, bezogen auf die Konzentration des kleinsten Standards mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N)  $\geq 3$ , an. Diese lagen für die reinen Standardlösungen zwischen 0,2 und 3 ng/mL. Die Nachweisgrenzen, bezogen auf den Gehalt in der Hausstaubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$ , lagen in einem Bereich von 1,1  $\mu\text{g/kg}$  für Citrinin und 6,0  $\mu\text{g/kg}$  für Deoxynivalenol. Weitere Angaben sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 47).

Tabelle 27: Analytische Kenndaten der acht Mykotoxine für die Quantifizierungsmethode mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie, Instrumentelle Nachweisgrenze bezogen auf die Konzentration des kleinsten Standards mit  $S/N \geq 3$ , (Nachweis-, Erfassungsgrenzen berechnet nach DIN 32645)

Mykotoxin	Retentionszeit [min]	Instrumentelle Nachweisgrenze [ng/mL]	Nachweisgrenze für Hausstaub $\leq 63 \mu\text{m}$ [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Erfassungsgrenze für Hausstaub $\leq 63 \mu\text{m}$ [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Bestimmungsgrenze für Hausstaub $\leq 63 \mu\text{m}$ [ $\mu\text{g/kg}$ ]
Aflatoxin B1	4,4	0,2	1,5	3,0	5,3
Diacetoxyscirpenol	4,6	1	5,1	11	16
Gliotoxin	4,7	1	3,6	7,1	11
Roridin A	6,3	0,5	1,9	3,8	6,6
Ochratoxin A	7,4	0,5	2,1	4,1	7,2
Sterigmatocystin	8,2	0,5	1,4	2,9	5,1
Deoxynivalenol	3,9	3	6,0	12	18
Citrinin	5,5	0,2	1,1	2,3	4,0

Die Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeit wurden in Anlehnung an Matuczewski et al. (2003) berechnet. An zwei Tagen wurde eine Dreifachbestimmung mit je drei verschiedenen Konzentrationen mit dem hergestellten Poolstaub (Kapitel 3.3.2) durchgeführt. Im Anhang befinden sich die einzelnen Ergebnisse (Tabelle 48 und Tabelle 49). Die Präzision innerhalb des ersten Tages war für alle Mykotoxine deutlich kleiner als 20 % und damit sehr gut. Für den zweiten Tag waren die relativen Standardabweichungen insgesamt etwas höher. Bei Citrinin wurden bei allen Dotierungsniveaus die höchsten Abweichungen bestimmt.

In der nachfolgenden Tabelle 28 sind die aus allen Konzentrationsniveaus gebildeten Mittelwerte der Matrixwiederfindung (ME), der Extraktionswiederfindung (RE) und der Prozesswiederfindung (PE) für die beiden Tage dargestellt. Für die mittlere Matrixwiederfindung, bestimmt durch die Zugabe von Standardlösungen in eine Blindprobe aus Poolstaub direkt vor der Messung, wurden Werte zwischen 31,9 % für Deoxynivalenol und 57,6 % für Ochratoxin A bestimmt. Die relativen Standardabweichungen sind bei den Analyten Gliotoxin und Citrinin über 20 %. Die Extraktionswiederfindung, berechnet als Quotient der dotierten Probe vor und nach der Extraktion ist mit einem Wert von 87,3 % bei Deoxynivalenol unter 100 %. Alle anderen Werte liegen über 100 %. Die Prozesswiederfindung, als Maß für die Effektivität der gesamten Methode ist mit 40 % bei Deoxynivalenol am geringsten. Für Sterigmatocystin wurde der höchste Wert von 88,9 % bestimmt. Die relativen Standardabweichungen sind nur bei Aflatoxin B<sub>1</sub>, Gliotoxin und Citrinin über 20 %. Die Schwankungen von Tag zu Tag sind nicht für alle Analyten gleich und daher nicht systematisch, sondern auf die Streuung einzelner Werte zurückzuführen.

Tabelle 28: Wiederfindungsraten der acht Mykotoxine für die Quantifizierungsmethode mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie bestimmt an zwei Tagen. (Matrixwiederfindung [ME], Extraktionswiederfindung [RE] und Prozesswiederfindung [PE])

	<b>Aflatoxin B1</b>	<b>Diacetoxy- scirpenol</b>	<b>Ochra- toxin A</b>	<b>Sterigma- tocystin</b>	<b>Glio- toxin</b>	<b>Ror- idin A</b>	<b>Deoxy- nivalenol</b>	<b>Cit- rinin</b>
Mittlere (ME 1) [%]	29,8	41,7	55,9	54,5	35,6	51,3	36,3	28,7
Mittlere (ME 2) [%]	34,7	37,5	59,4	57,8	47,9	51,5	27,6	50,7
Mittelwert [%]	32,2	39,6	57,6	56,1	41,7	51,4	31,9	39,7
Standardabweichung	3,45	3,00	2,43	2,32	8,66	0,12	6,17	15,57
Relative Standard- abweichung [%]	10,7	7,6	4,2	4,1	20,8	0,2	19,3	39,3
Mittlere (RE 1) [%]	125,1	112,9	111,5	139,5	124,9	118,2	85,0	110,3
Mittlere (RE 2) [%]	141,9	112,5	109,1	140,5	129,5	122,3	89,6	110,6
Mittelwert [%]	133,5	112,7	110,3	140,0	127,2	120,3	87,3	110,5
Standardabweichung	11,85	0,31	1,70	0,73	3,22	2,93	3,26	0,22
Relative Standard- abweichung [%]	8,9	0,3	1,5	0,5	2,5	2,4	3,7	0,2
Mittlere (PE 1) [%]	42,8	54,1	72,0	86,9	50,3	69,9	43,3	47,2
Mittlere (PE 2) [%]	56,9	48,6	73,9	91,0	70,6	71,5	36,6	83,5
Mittelwert [%]	49,9	51,3	73,0	88,9	60,5	70,7	40,0	65,3
Standardabweichung	10,00	3,88	1,33	2,91	14,36	1,12	4,77	25,63
Relative Standard- abweichung [%]	20,1	7,6	1,8	3,3	23,7	1,6	11,9	39,2

#### **4.2.2 Methode zur Quantifizierung mittels HPLC-Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie**

Die nachfolgende Tabelle 29 fasst die Nachweisgrenzen und Retentionszeiten der entwickelten Methode zusammen. Die dritte Spalte gibt die instrumentellen Nachweisgrenzen der reinen Standardlösungen, bezogen auf die Konzentration mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N)  $\geq 3$ , an. Die geringste Nachweisstärke hatte Citrinin. Es konnte erst ab einer Konzentration von 5 ng/mL ausgewertet werden.

Tabelle 29: Nachweisgrenze und Retentionszeit der acht Mykotoxine für die Quantifizierungsmethode mittels HPLC-Quadrupolflugzeitmassenspektrometrie, Instrumentelle Nachweisgrenze bezogen auf die Konzentration des kleinsten Standards mit  $S/N \geq 3$

<b>Mykotoxin</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>	<b>Instrumentelle Nachweisgrenze [ng/mL]</b>
Aflatoxin B1	10,8	0,1
Diacetoxyscirpenol	10,7	0,1
Gliotoxin	10,9	0,5
Roridin A	13,0	0,5
Ochratoxin A	13,9	0,1
Sterigmatocystin	14,2	0,1
Deoxynivalenol	6,0	1
Citrinin	12,8	5

#### **4.2.3 Nachweis in Innenraummaterialien**

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der quantitativen (Aflatoxin B1, Citrinin, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin) und qualitativen (Satratoxin G, Satratoxin H und Roridin L-2) Analyse mittels HPLC-MS/MS (Kapitel 3.5.1) in Hausstaub- und Baustoffproben nachgewiesenen Mykotoxine dargestellt (Portner et al. 2011). Insgesamt wurden 854 Hausstaubproben aus zwei unterschiedlichen Sammelphasen bzw. Kollektiven untersucht (Kapitel 3.3.1). Die „NLL-Proben“ (n = 500) entstammten aus dem bevölkerungsrepräsentativen Kollektiv der Kontrollproben der Norddeutschen Leukämie- und Lymphomstudie (NLL) (Hoffmann et al. 2008). Das Kollektiv der 354 selbst gesammelten Hausstaubproben setzt sich aus Proben aus Haushalten mit sichtbarem Schimmelpilzbefall im Wohnraum („Schadensfallproben“, n = 153) und Kontrollproben aus Haushalten ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum („Kontrollproben“, n = 201) zusammen.



### Ergebnisse aller Hausstaubproben

Tabelle 30 fasst die quantitativen und qualitativen Ergebnisse der 854 analysierten Hausstaubproben zusammen (Kapitel 3.3.1). Insgesamt konnten in 29 Proben vier der acht Mykotoxine quantifiziert werden. Dabei wurde Sterigmatocystin in 14 Proben im Konzentrationsbereich von 15-2.070 µg/kg, Deoxynivalenol in neun Proben im Konzentrationsbereich von 140-2.438 µg/kg Hausstaub gefunden. Ochratoxin A und Citrinin waren in 4 bzw. 2 Proben mit einem maximalen Gehalt von 13 µg/kg für OTA bzw. 42 µg/kg für Citrinin im Hausstaub enthalten. In jeweils einer Probe wurde Satratoxin H und Roridin L-2 qualitativ nachgewiesen.

Tabelle 30: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 854 untersuchten Hausstaubproben; (Staubfraktion ≤ 63 µm) (< BSG = kleiner Bestimmungsgrenze)

	Ochratoxin A [µg/kg]	Sterigmatocystin [µg/kg]	Citrinin [µg/kg]	Deoxynivalenol [µg/kg]	Satratoxin H	Roridin L-2
Anzahl positiver Proben	4	14	2	9	1	1
Kleinster Wert	< BSG	< BSG	< BSG	< BSG		
Größter Wert	13	2.070	42	2.438		

### Ergebnisse der „NLL-Proben“

Es wurden 500 Kontrollproben aus dem bevölkerungsrepräsentativen Kollektiv der NLL-Studie analysiert (Hoffmann et al. 2008) (Kapitel 3.3.1). In neun Hausstaubproben konnten fünf unterschiedliche Mykotoxine nachgewiesen werden (Tabelle 31). Sterigmatocystin wurde viermal in einem Konzentrationsbereich von 80-1.121 µg/kg Hausstaub bestimmt. OTA wurde in zwei Proben mit einer Konzentration von 8 und 13 µg/kg Hausstaub bestimmt.

Tabelle 31: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 500 untersuchten Kontrollproben aus der NLL-Studie (Hoffmann et al. 2008); (Staubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$ )  
( $< \text{BSG}$  = kleiner Bestimmungsgrenze)

	Ochratoxin A [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Sterigmatocystin [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Citrinin [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Deoxynivalenol [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Satratoxin H
Anzahl positiver Proben	2	4	1	1	1
Kleinster Wert	$< \text{BSG}$	$< \text{BSG}$	$< \text{BSG}$	$< \text{BSG}$	
Größter Wert	13	1.121	42	2.438	

### Ergebnisse der „Schadensfallproben“

153 Studienteilnehmer hatten im Fragebogen der selbst gesammelten Proben angegeben, dass ein sichtbarer Schimmelpilzbefall im Wohnraum vorlag (Kapitel 3.3.1). In zehn Proben konnten die Mykotoxine Ochratoxin A, Sterigmatocystin und Deoxynivalenol nachgewiesen werden (Tabelle 32). Sechs Fallproben enthielten Sterigmatocystin in einem Konzentrationsbereich von 20-172  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Hausstaub. Der Konzentrationsbereich für den Nachweis von Deoxynivalenol betrug 140–1.685  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Hausstaub. OTA wurde in einer Probe mit 9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Hausstaub bestimmt.

Tabelle 32: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 153 selbst gesammelten Schadensfallproben; (Staubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$ )  
( $< \text{BSG}$  = kleiner Bestimmungsgrenze)

	Ochratoxin A [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Sterigmatocystin [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Deoxynivalenol [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Anzahl positiver Proben	1	6	3
Kleinster Wert	$< \text{BSG}$	$< \text{BSG}$	$< \text{BSG}$
Größter Wert	9	172	1.685

### Ergebnisse der „Kontrollproben“

Tabelle 33 fasst die Ergebnisse der 201 selbst gesammelten Kontrollproben aus Wohnungen ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum zusammen (Kapitel

3.3.1). Es wurden vier Mykotoxine quantitativ und eines qualitativ nachgewiesen. Sterigmatocystin wurde in vier Proben in einem Konzentrationsbereich von 15-2.070 µg/kg Hausstaub nachgewiesen. Der Konzentrationsbereich für Deoxynivalenol in den fünf positiven Proben beträgt 184–1.050 µg/kg Hausstaub. OTA und Citrinin wurden in je einer Probe mit 4 µg/kg und 28 µg/kg Hausstaub bestimmt. Roridin L-2 wurde in einer Probe qualitativ nachgewiesen.

Tabelle 33: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 201 selbst gesammelten Kontrollproben; (Staubfraktion ≤ 63 µm) (< BSG = kleiner Bestimmungsgrenze)

	Ochratoxin A [µg/kg]	Sterigmatocystin [µg/kg]	Citrinin [µg/kg]	Deoxynivalenol [µg/kg]	Roridin L-2
Anzahl positiver Proben	1	4	1	5	1
Kleinster Wert	< BSG	< BSG	< BSG	< BSG	
Größter Wert	4	2.070	28	1.050	

### Ergebnisse der Baustoffproben

Neben den Hausstaubproben wurden 18 Baustoffproben mit der in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Quantifizierungsmethode analysiert. In einer Baustaubprobe aus einem mit Schimmelpilzen befallenen Gebäude und in einem Stück Tapete konnte Sterigmatocystin nachgewiesen werden (Tabelle 34). Die Abbildung 32 zeigt den gesamten Schimmelpilzbefall. Auf dieser Tapete konnten die Spezies *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporoides* und *Penicillium chrysogenum* differenziert werden. Der Gehalt von Sterigmatocystin auf der Tapete wurde mit 509 µg/kg bzw. 1,5 µg/cm<sup>2</sup> in der Probe bestimmt.



Abbildung 32: Ansicht einer mit Schimmelpilzen befallenen Tapete auf einer Außenwand

Tabelle 34: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der ausgewählten Mykotoxine in den 18 untersuchten Baustoffproben (< BSG = kleiner Bestimmungsgrenze)

	<b>Sterigmatocystin</b>
	[µg/kg]
Anzahl positiver Proben	2
Kleinster Wert	< BSG
Größter Wert	509

#### **4.2.4 Auswertung der Fragebögen der selbst gesammelten Hausstaubproben**

##### **Vergleich der gefundenen Mykotoxine und der kultivierbare Schimmelpilze**

In den gemeinsam mit der Universität Oldenburg gesammelten Hausstaubproben wurden die Anzahl, Art und Spezies der kultivierbaren Schimmelpilze bestimmt (Toepfer 2010). Die Inkubation wurde bei 25 °C auf Malzextraktagar (MEA) und Dichloran-Glycerin-Agar (DG18) durchgeführt. In Tabelle 35 sind für die selbst gesammelten Schadensfall- und Kontrollproben in denen Sterigmatocystin nachweisbar war, der Toxingehalt in der Hausstaubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$  und die Anzahl der kultivierbaren Einheiten (KBE) von *Aspergillus versicolor* zusammengestellt. Bei mehr als der Hälfte ( $n = 170$ ) aller untersuchten Hausstaubproben des selbst gesammelten Kollektivs konnte *Aspergillus versicolor* nachgewiesen werden (Toepfer 2010), während Sterigmatocystin nur in 9 Proben gefunden wurde. Weitere bekannte potentielle Sterig-

matocystin produzierende Schimmelpilz-Arten konnten in diesem Kollektiv nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 35: Vergleich der Gehalte an Sterigmatocystin und von *Aspergillus versicolor* in den selbst gesammelten Hausstaubproben, in denen Sterigmatocystin nachgewiesen werden konnte (Staubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$ ; Anzahl der kultivierbaren Einheiten [KBE] für Inkubation bei 25 °C auf Malzextraktagar [MEA] und Dichloran-Glycerin-Agar [DG18])

	<b>Sterigmatocystin</b> [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	<b>MEA [KBE/g]</b>	<b>DG18 [KBE/g]</b>
Schadensfallprobe 1	54	< 1.000	< 1.000
Schadensfallprobe 2	127	3.600.000	6.000.000
Schadensfallprobe 3	172	18.000.000	14.000.000
Schadensfallprobe 4	53	4.000.000	3.500.000
Schadensfallprobe 5	20	8.000.000	6.000.000
Schadensfallprobe 6	36	2.200.000	2.800.000
Kontrollprobe 1	2.070	30.000	< 1.000
Kontrollprobe 2	39	< 1.000	< 1.000
Kontrollprobe 3	15	< 1.000	< 1.000
Kontrollprobe 4	52	60.000	290.000

Tabelle 36 zeigt die Gehalten an Deoxynivalenol und den kultivierbaren *Fusarien spp.* für die Hausstaubproben, in denen Deoxynivalenol nachgewiesen werden konnte. Nur bei 50 % der Proben, in denen dieses Mykotoxin nachweisbar war, konnten auch *Fusarien spp.* bestimmt werden.

Tabelle 36: Vergleich der Gehalte an Deoxynivalenol und kultivierbaren *Fusarien spp.* in den selbst gesammelten Hausstaubproben, in denen Deoxynivalenol nachgewiesen werden konnte (Staubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$ ; Anzahl der kultivierbaren Einheiten (KBE) für Inkubation bei 25 °C auf Malzextraktagar (MEA) und Dichloran-Glycerin-Agar (DG18))

	<b>Deoxynivalenol</b> [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	<b>MEA [KBE/g]</b>	<b>DG18 [KBE/g]</b>
Schadensfallprobe 1	885	30.000	50.000
Schadensfallprobe 2	1.685	< 1.000	< 1.000
Schadensfallprobe 3	140	1.000	< 1.000
Kontrollprobe 1	184	< 1.000	< 1.000
Kontrollprobe 2	340	< 1.000	< 1.000
Kontrollprobe 3	495	30.000	< 1.000
Kontrollprobe 4	1.050	6.000	10.000
Kontrollprobe 5	1.050	< 1.000	< 1.000

### **Geben die Fragebögen Hinweise auf Mykotoxine im Hausstaub?**

Zu den selbst gesammelten Hausstaubproben aus Wohnungen mit („Schadensfallproben“) und ohne („Kontrollproben“) sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum wurde jeweils ein Fragebogen (Anhang, Tabelle 50) erhoben. Dieser sollte Auskunft über die Lage, die Eigenschaften, die Ausstattung und Belegung der Wohnungen/ des Gebäudes, das Nutzerverhalten der Bewohner und das Vorkommen von Schimmelpilzbefall geben. Die Einflussfaktoren auf den Gehalt an Mykotoxinen in den Hausstaubproben wurde in Bezug auf die Haltung von Haustieren, einen aktuellen oder zurückliegenden Schimmelpilzbefall, die Sammlung von Biomüll in der Wohnung, die Anzahl der Topfpflanzen und die Lage des Gebäudes untersucht. Die Hausstaubproben wurden nach der in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Methode auf ausgewählte Mykotoxine analysiert. Aufgrund der geringen Anzahl der positiven Befunde konnte keine signifikanten Einflussfaktoren oder Unterschiede zwischen Schadensfall- und Kontrollproben gefunden werden. Die Geschossigkeit und die Umgebung um das Gebäude zeigten keinen Zusammenhang mit dem Toxingehalt auf. Auch Bauwerksmängel oder die Art der Fenster ließen keine Rückschlüsse auf das Vorkommen von Mykotoxinen zu. In 75 % der Schadensfall- und 27 % der Kontrollproben wurde von den Studienteilnehmern ein muffiger Geruch in der Wohnung wahrgenommen. Die Haltung von Haustieren zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang zu den bestimmten Toxinen. Die Frage nach der Sammlung von Biomüll in der Wohnung wurde bei 45 % der Kontroll- und 62,5 % der Schadensfallproben mit ja beantwortet. Topfpflanzen wurden in 90 % der Kontrollen und 87,5 % der Fallproben in den Wohnungen aufgestellt. Die Größe der mit Schimmelpilzen befallenen Fläche in den Schadensfallproben von DIN A4 Größe bis zu 50 m<sup>2</sup> zeigte keinen Einfluss auf die Gehalte an Mykotoxinen in den analysierten Proben.

Aufgrund des vergleichsweise seltenen Vorkommens der untersuchten Mykotoxine in den selbst gesammelten Hausstaubproben, konnte ein Zusammenhang zwischen den Eigenschaften der Wohnungen oder dem Nutzungsverhalten der Bewohner und dem Vorkommen von Mykotoxinen nicht geklärt werden.

#### 4.2.5 Bestimmung des Wasser- und Glühverlust der selbst gesammelten Hausstaubproben

Im Folgenden ist der Wasserverlust als Maß für die Feuchtigkeit (Abbildung 33) und der Glühverlust als Maß für den Anteil von organischen Substanzen der selbst gesammelten Hausstaubproben dargestellt (Abbildung 34). Bei einem Median von 3,8 % war nur eine Probe mit einem Wasserverlust von 41 % als feucht zu bezeichnen (Tabelle 37). Die Variation beim Glühverlust lag zwischen 15,3 – 95,5 %. Zwischen Kontroll- und Schadensfallproben war kein signifikanter Unterschied messbar (U-Test nach Mann-Whitney).

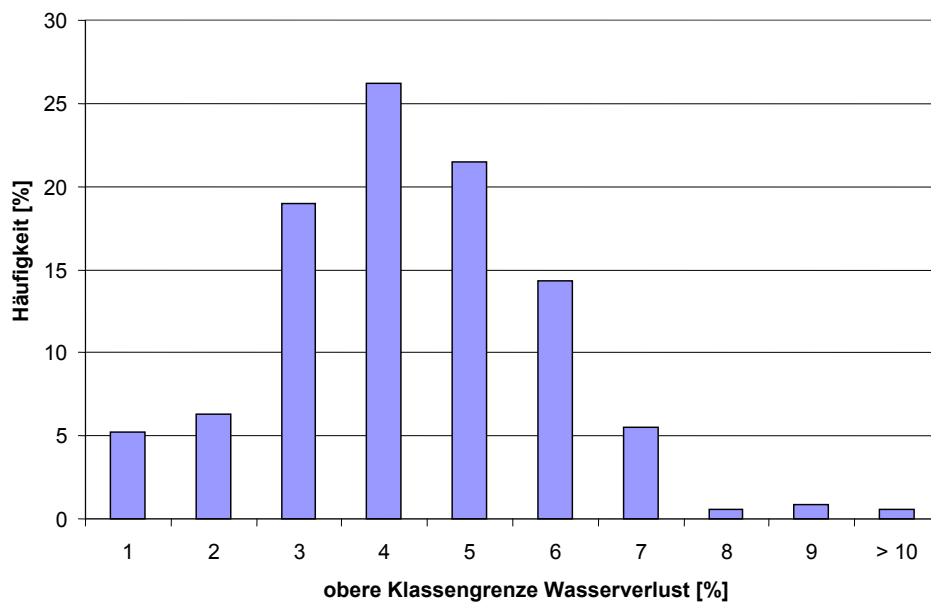


Abbildung 33: Relative Häufigkeitsverteilung des Wasserverlustes der untersuchten Schadensfall- und Kontrollproben (n = 354)

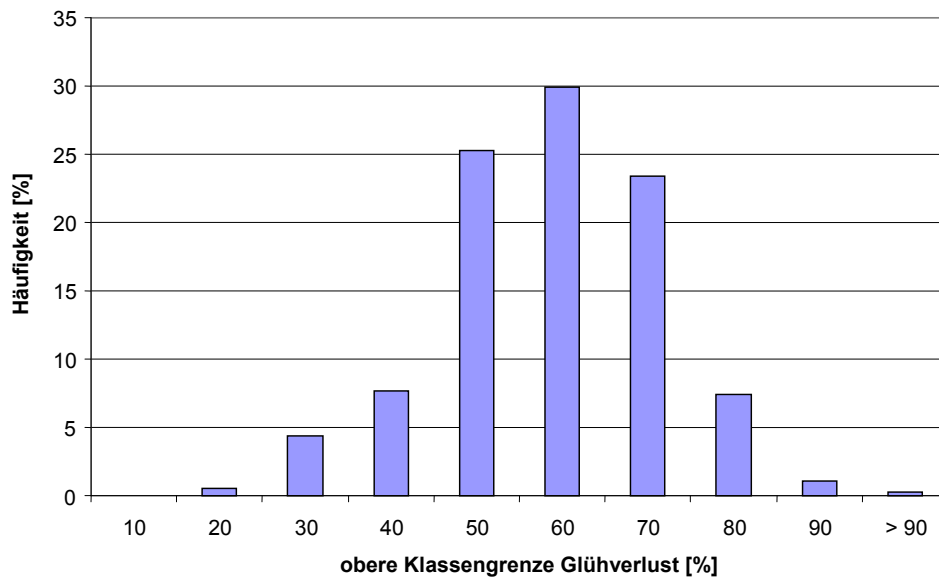


Abbildung 34: Relative Häufigkeitsverteilung des Glühverlustes der untersuchten Schadensfall- und Kontrollproben (n = 354)

Tabelle 37: Verteilung des Wasser- und Glühverlustes aller untersuchten Schadensfall- und Kontrollproben (n = 354)

	<b>Wasserverlust [%]</b>	<b>Glühverlust (%)</b>
Größter Wert	41,0	95,5
Kleinster Wert	0,0	15,3
Median	3,8	54,6
Mittelwert	3,9	54,0



### 4.3 Qualitativer Nachweis von Mykotoxinen beim Fehlen von Referenzsubstanzen am Beispiel von *Stachybotrys chartarum*

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse zum qualitativen Nachweis von Mykotoxinen dargestellt (Portner et al. 2009a, Portner et al. 2009b).

#### 4.3.1 Identifizierung von Mykotoxinen mittels Hybridmassenspektrometrie

Die Ergebnisse zum qualitativen Nachweis von Mykotoxinen sind im Folgenden am Beispiel des makrocyclischen Trichothecens Satratoxin H dargestellt. Hierzu wurden die Wildstammisolate S1-S4 kultiviert (Kapitel 3.4.1), mit Chloroform und Methanol im Verhältnis 1:1 extrahiert (Kapitel 3.4.2) und nach Anreicherung durch SPE anschließend mit der in Kapitel 3.5.3 beschriebene Screeningmethode mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie analysiert. Die Abbildung 35 zeigt das Totalionenchromatogramm einer extrahierten Probe von dem *Stachybotrys chartarum* Stamm S1.

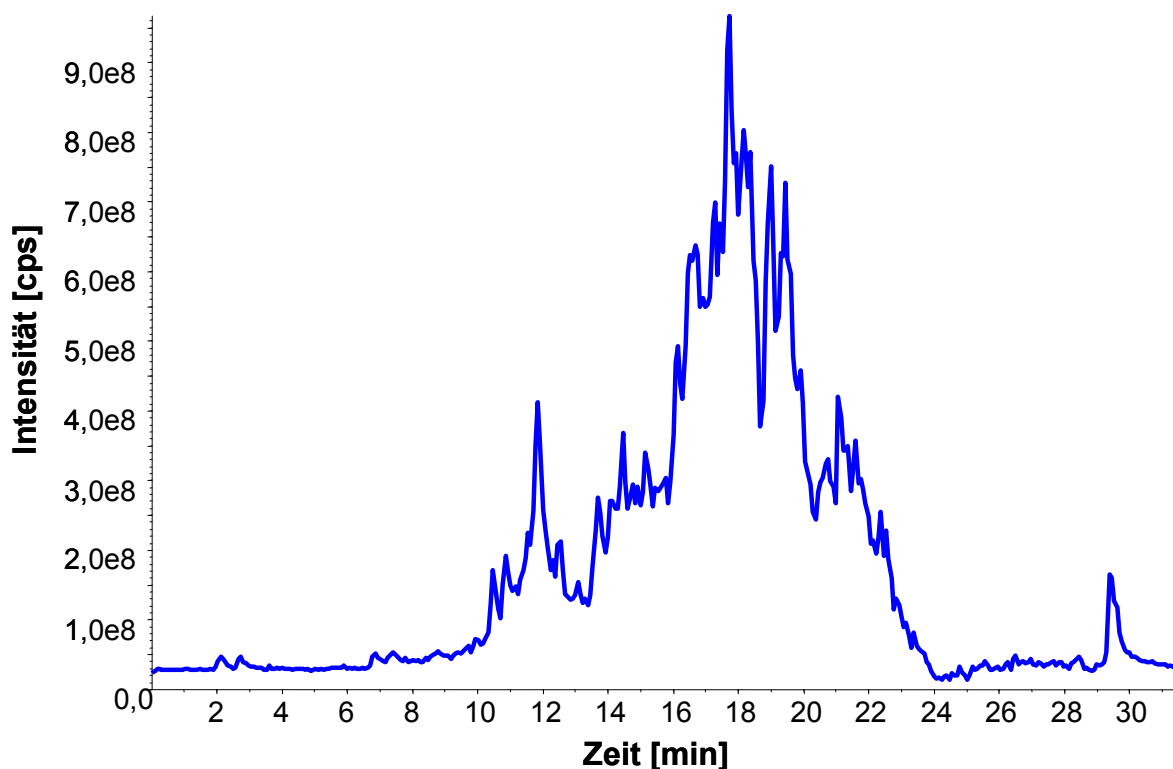


Abbildung 35: Totalionenchromatogramm einer mit Chloroform und Methanol im Verhältnis 1:1 extrahierten Probe vom *Stachybotrys chartarum* Stamm S1

Aus dem Totalionenchromatogramm lässt sich die dem protonierten Vorläuferion von Satratoxin H ( $529\ m/z$ ,  $[M+H]^+$ ) entsprechende Massenspur extrahieren (Abbildung 36). In diesem Chromatogramm sind zur Retentionszeit 14,09 und 15,23 min zwei Peaks zu erkennen.

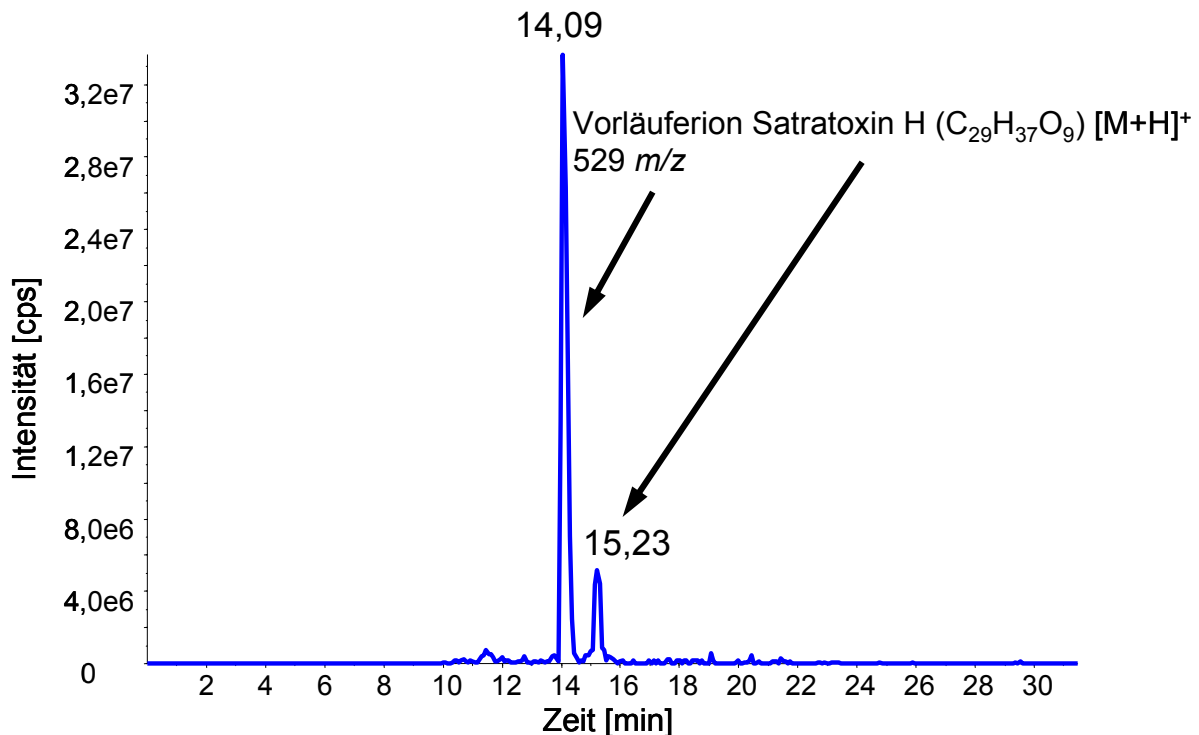


Abbildung 36: Chromatogramm der extrahierten Massenspur  $529\ m/z$  des Extraktes von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1 mit zwei charakteristischen Peaks zur Retentionszeit von 14,09 und 15,23 min.

In Abbildung 37 ist das zur Retentionszeit von 14,09 min registrierte Totalionenspektrum abgebildet. Es sind zwei für Satratoxin H charakteristische Ionen zu erkennen. Zum einen das protonierte Vorläuferion von Satratoxin H ( $529\ m/z$ ;  $[M+H]^+$ ) und zum anderen das entsprechende Natrium-Addukt ( $551\ m/z$ ;  $[M+Na]^+$ ). Das Ion  $m/z\ 511$  könnte auf in der Ionenquelle vom Vorläuferion abgespaltenes Wasser ( $[M-H_2O+H]^+$ ) zurückzuführen sein.

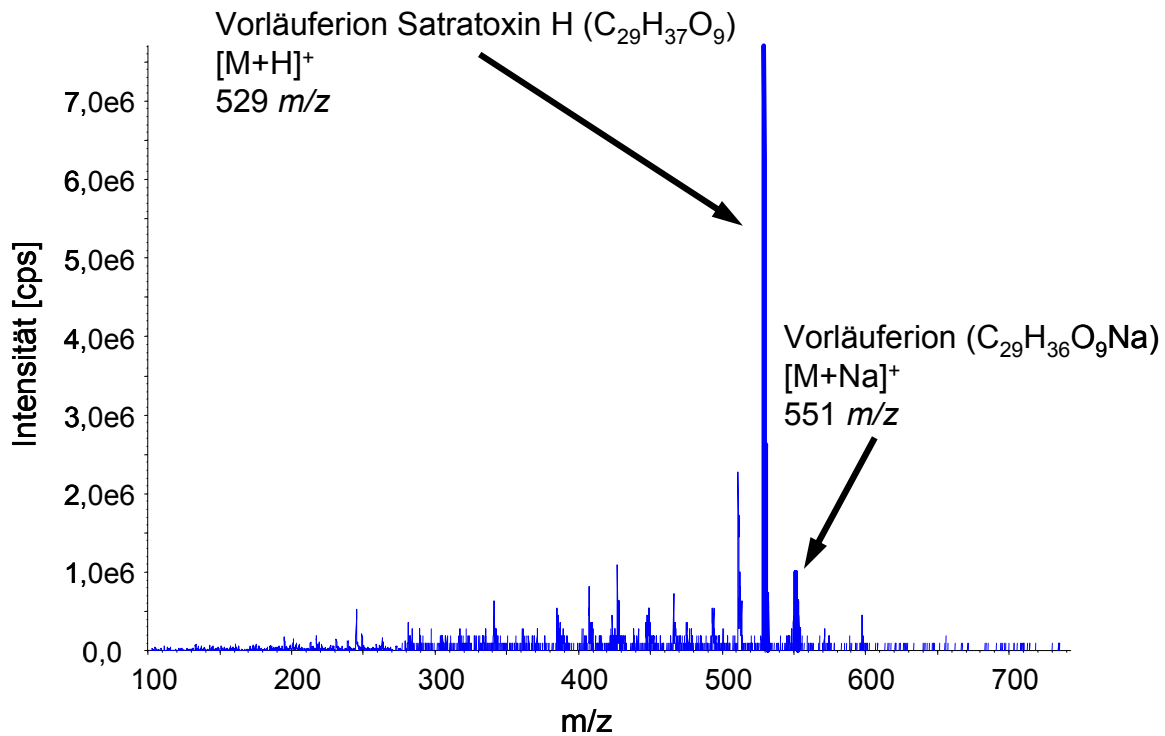


Abbildung 37: Totalionenspektrum zur Retentionszeit 14,09 min der Masse 529  $m/z$  eines Extraktes von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1

Zur Retentionszeit von 14,09 min wurde auch ein Produktionenspektrum mit gestreuter Kollisionsenergie vom Vorläuferion 529  $m/z$  aufgenommen (Abbildung 38). Es bilden sich zwei charakteristische Produktionen mit  $m/z$  249 und 231. Die Differenz von 18 ergibt sich durch die Abspaltung von Wasser. Diese Ionen können dem Terpenring des Trichothecengrundgerüsts zugeordnet werden (Tuomi et al. 1998, Gottschalk et al. 2006).

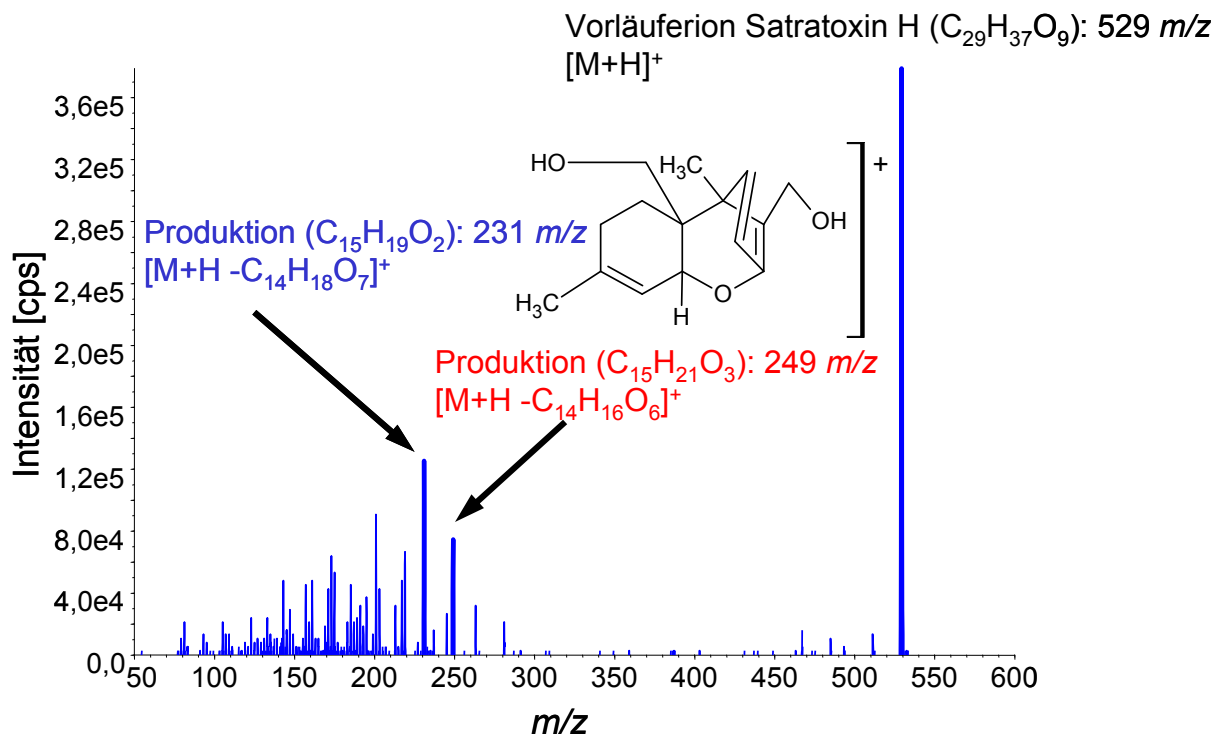


Abbildung 38: Produktionspektrum vom Vorläuferion 529  $m/z$  eines Extraktes von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1

Das Fragmentierungsmuster von Satratoxin H (Q1: 529  $m/z$  – Q3: 249 und 231  $m/z$ ) wurde in eine MRM-Methode übertragen (Abbildung 39). Auch hier wurden zwei chromatographisch getrennte Peaks bei 14,07 und 15,18 min für Satratoxin H erhalten. Da in der Literatur sowohl für Satratoxin G als auch für Satratoxin H jeweils zwei Stereoisomere beschrieben wurden, konnten diese beiden Analyten am Fragmentierungsmuster identifiziert werden (Eppley et al. 1977, Eppley et al. 1980, Harrach et al. 1981, Jarvis et al. 1986, Jarvis et al. 1995). Eine Zuordnung der Isomere zu den einzelnen Peaks ist mit dieser Messtechnik ohne Referenzsubstanzen allerdings nicht möglich.

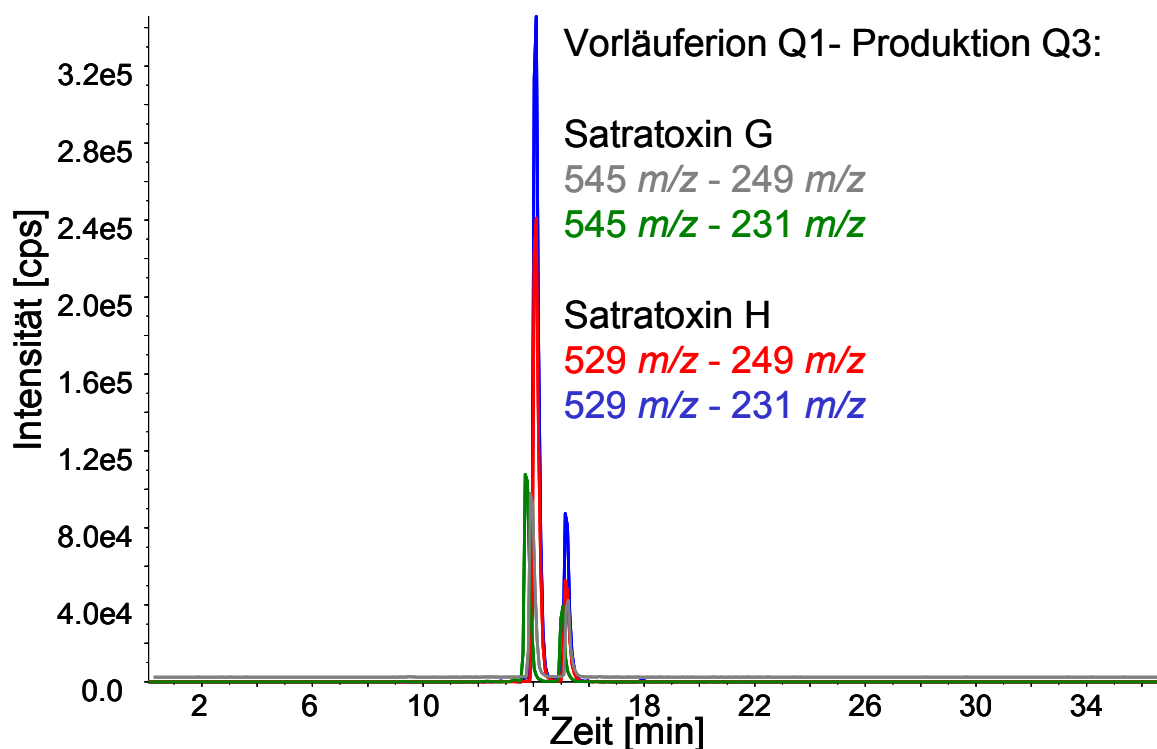


Abbildung 39: MRM-Chromatogramm von Satratoxin G und H einer extrahierten Probe von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1

Die Identifizierung weiterer makrocyclischer Trichothecene wie Satratoxin G oder Roridin L-2 erfolgte analog der oben beschriebenen Methode. Die Tabelle 38 fasst die aus den analytspezifischen Produktionenspektren der Mykotoxine abgeleiteten MS-Parameter für die MRM-Methode zusammen. Diese wurden in die in Kapitel 3.5.1 beschriebene Methode übertragen und anschließend für die weiteren Untersuchungen angewendet.

Tabelle 38: MS-Parameter für die identifizierten Mykotoxine von *Stachybotrys chartarum*

Mykotoxin	Vorläuferion Q1 [ $m/z$ ]	Art Vorläuferion Q1	Produktion Q3 [ $m/z$ ]	Produktion Q3 [ $m/z$ ]
Roridin L-2	531	$[M+H]^+$	249	231
Satratoxin G / Isosatratoxin G	545	$[M+H]^+$	249	231
Satratoxin H / Isosatratoxin H	529	$[M+H]^+$	249	231
Trichoverrin A / B	533	$[M+H]^+$	249	231

### 4.3.2 Identifizierung von Mykotoxinen mittels Flugzeitmassenspektrometrie

Mit Hilfe des Cap-LC-TOF-MS erfolgte nach der in Kapitel 3.5.4 beschriebenen Methode der qualitative Nachweis der Mykotoxine in den zur Methodenentwicklung eingesetzten Extrakten der Stämme S1-S4 (Kapitel 3.4.2) anhand der Bestimmung der Summenformeln der Analyten und dem anschließendem Vergleich mit den Literaturangaben. Beispielhaft sind die Ergebnisse für Satratoxin G und H, sowie den jeweiligen Isomeren in der Abbildung 40 für den *Stachybotrys chartarum* Stamm S1 dargestellt. Die Masse der Summenformel von Satratoxin G konnte mit einer Genauigkeit von 5,7 ppm und für Satratoxin H mit einer Genauigkeit von -6,6 ppm bestimmt werden.

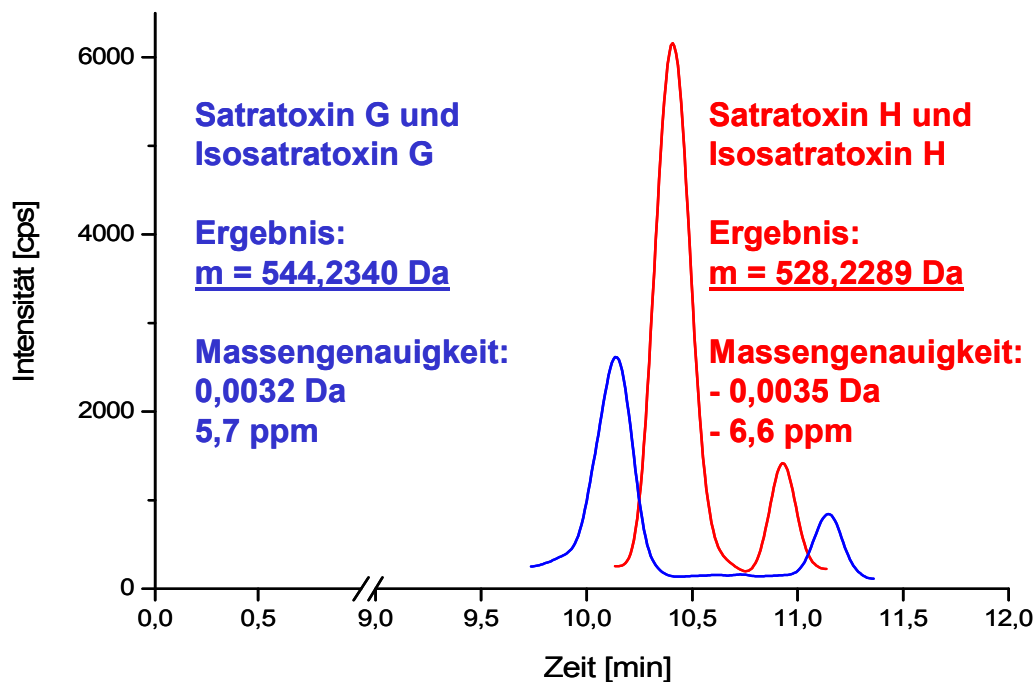


Abbildung 40: Cap-LC-TOF-MS Chromatogramm der extrahierten Massenspuren von Satratoxin G und H, sowie den jeweiligen Isomeren einer extrahierten Probe von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1

Dieselben mit dem Cap-LC-TOF-MS untersuchten Extrakte der Wildstammisolate S1-S4 von *Stachybotrys chartarum* (Kapitel 3.4.2) wurden auch mit der in Kapitel 3.5.5 beschriebenen Methode mit dem HPLC-QTOF-MS analysiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden am Beispiel von Satratoxin G und H für *Stachybotrys chartarum* Stamm S1 dargestellt. Beide Satratoxine und ihre Isomere konnten chroma-

tographisch getrennt und mit einer Massengenauigkeit von  $-0,1$  ppm für Satratoxin G und  $0,2$  ppm für Satratoxin H eindeutig anhand ihrer Summenformel bestimmt werden.

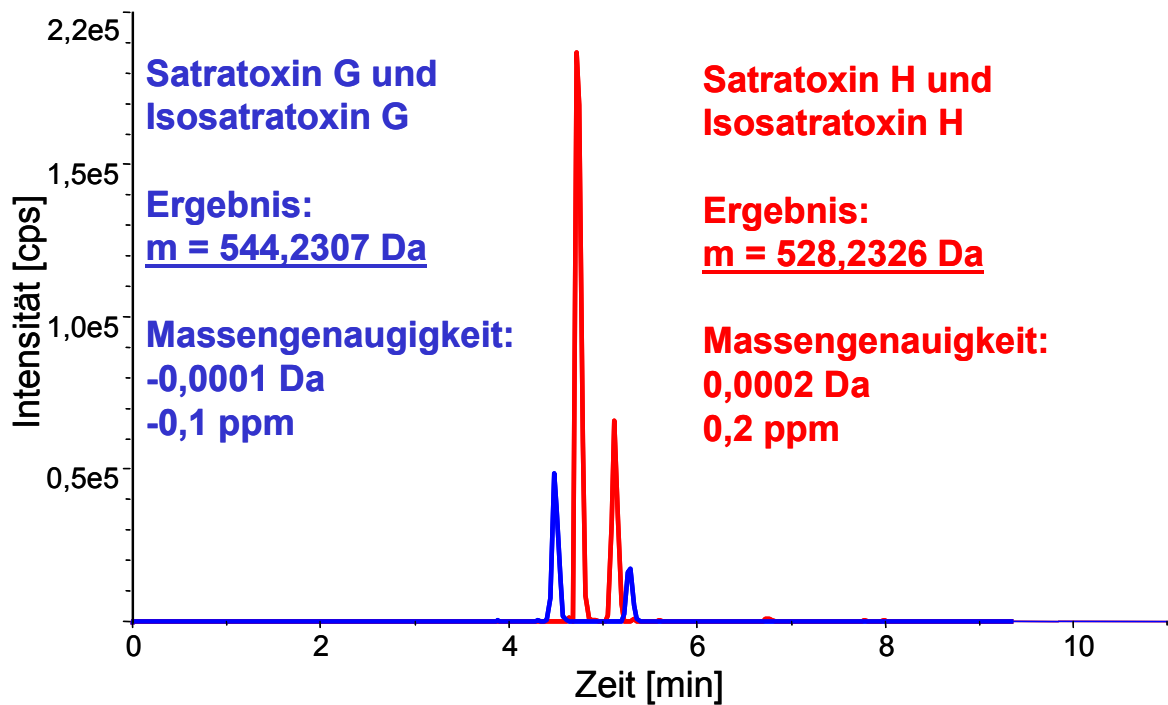


Abbildung 41: HPLC-QTOF-MS Chromatogramm der extrahierten Massenspuren von Satratoxin G und H sowie den jeweiligen Isomeren einer extrahierten Probe von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1

Abbildung 42 zeigt beispielhaft das Produktionenspektrum von Satratoxin H. Die Massengenauigkeit der beiden bestimmten Produktionen betrug bei  $m/z$  249  $0,6$  ppm und bei  $m/z$  231  $0$  ppm bezogen auf den theoretischen Wert.

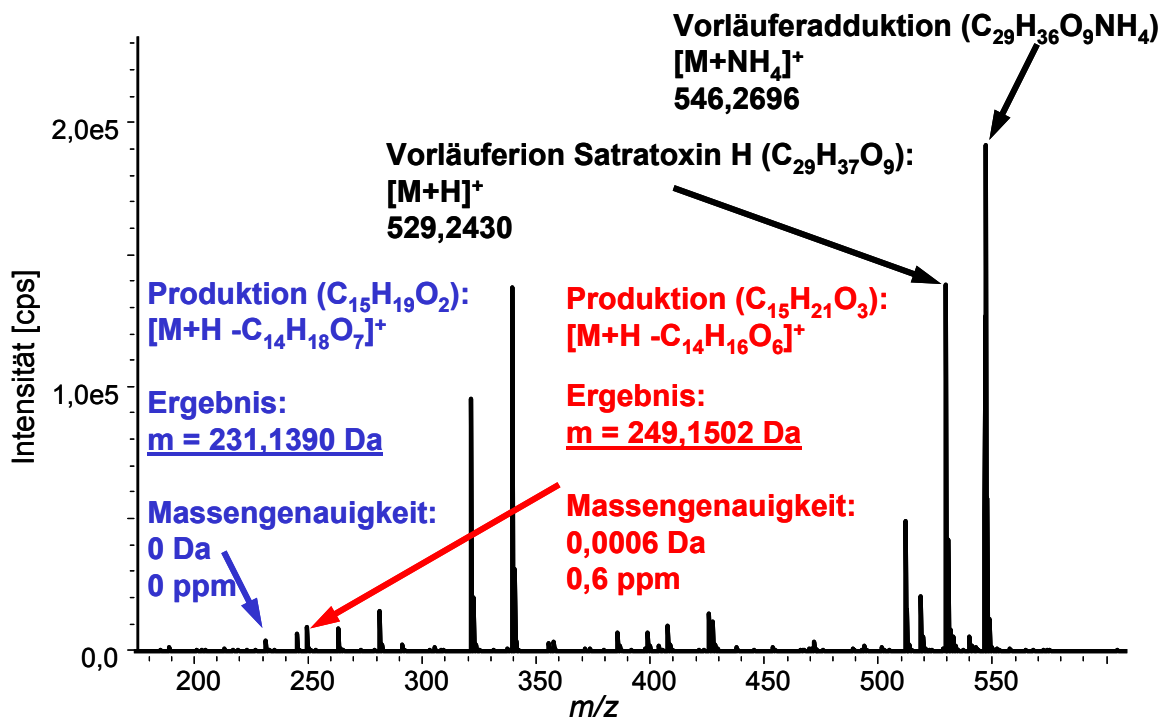


Abbildung 42: Produktionenspektrum von Satratoxin H bei 4,7 min. einer extrahierten Probe von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1

Das Produktionenspektrum von Satratoxin G ist in Abbildung 43 dargestellt. Die Massengenauigkeit der Produktionen  $m/z$  249 betrug 1,1 ppm und bei  $m/z$  231 4,7 ppm.

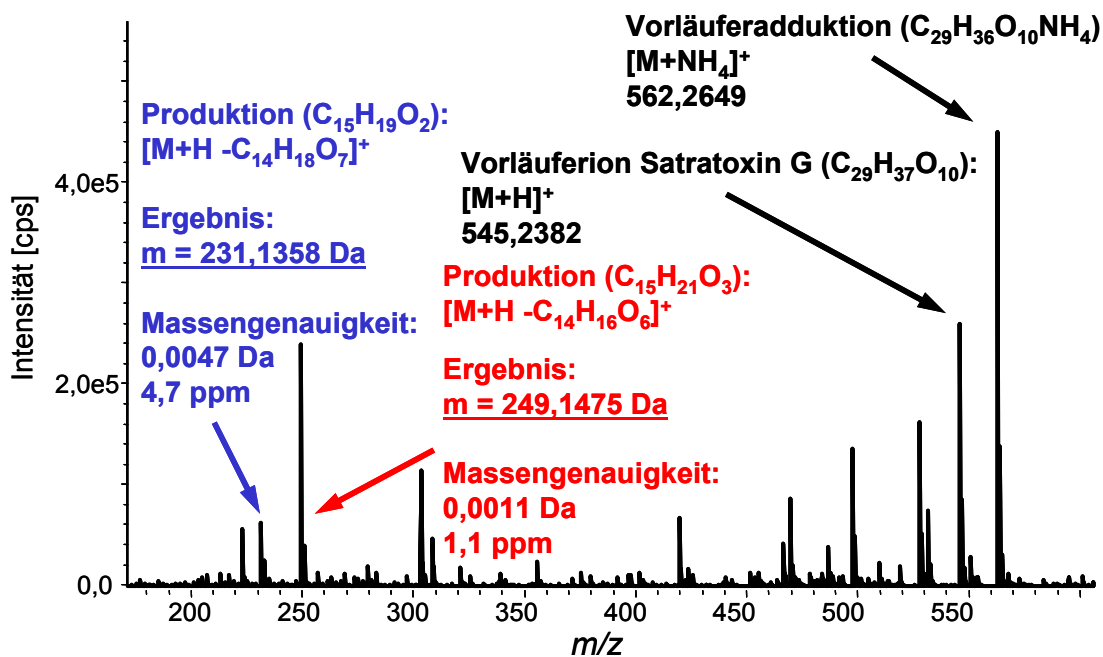


Abbildung 43: Produktionenspektrum von Satratoxin G bei 4,4 min. einer extrahierten Probe von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1



### 4.3.3 Unterscheidung der Chemotypen von *Stachybotrys chartarum*

Für den Schimmelpilz *Stachybotrys chartarum* sind zwei verschiedene Chemotypen bekannt (Jarvis und Hinkley 1999, Andersen et al. 2002). Die Ergebnisse zur Unterscheidung anhand des Toxinprofils sind im Folgenden beispielhaft für die in Kapitel 3.4 beschriebenen und zur Methodenentwicklung eingesetzten Proben der Wildstammisolate S1-S4 dargestellt. Die Untersuchung wurde mit den drei in Kapitel 3.5 vorgestellten Screening-Methoden durchgeführt. Die Verifizierung der Analyten erfolgte mit der Cap-LC-TOF-MS und HPLC-QTOF-MS durch die Bestätigung der Summenformeln (Tabelle 39, Seite 80 und Tabelle 40, Seite 81). Die Stämme S1, S2 und S4 sind dem Chemotyp S zuzuordnen, der makrocyclische Trichothecene bildet. Der Stamm S3 gehört zum Chemotyp A, der Atranone bilden kann. Die Abbildung 44 bis Abbildung 47 zeigen die Chromatogramme der Stämme S1-S4, die mit der Cap-LC-TOF-MS Messmethode analysiert wurden.

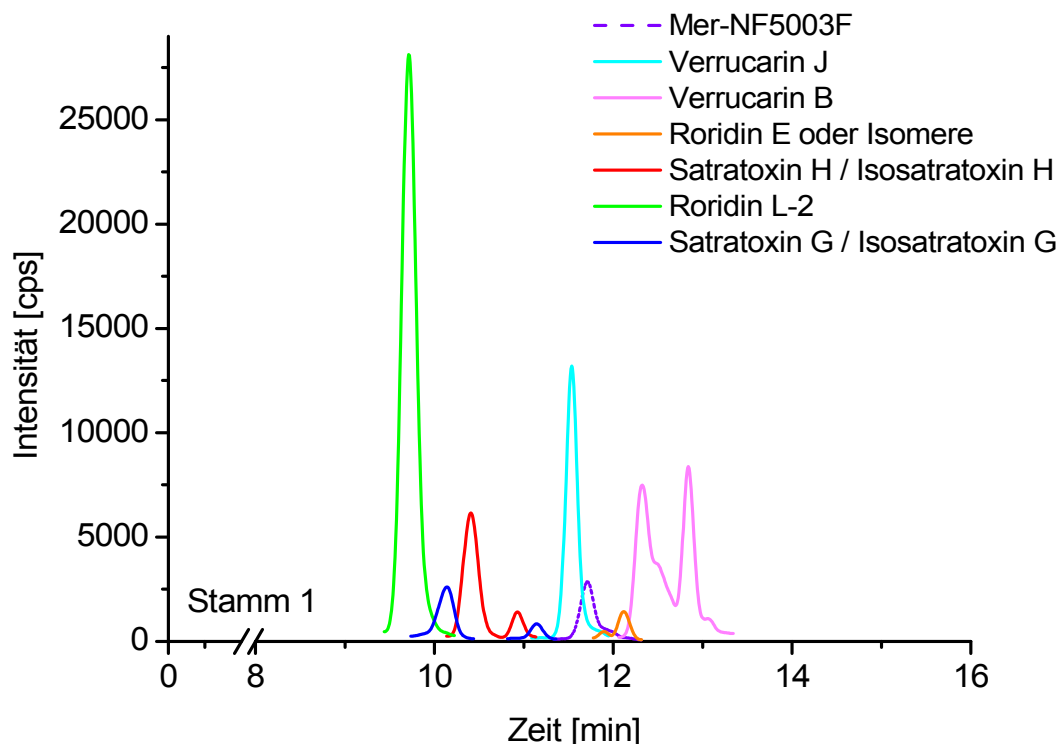


Abbildung 44: Chromatogramm der extrahierten Massenspuren für die identifizierten Mykotoxine in der Probe vom *Stachybotrys chartarum* Stamm S1

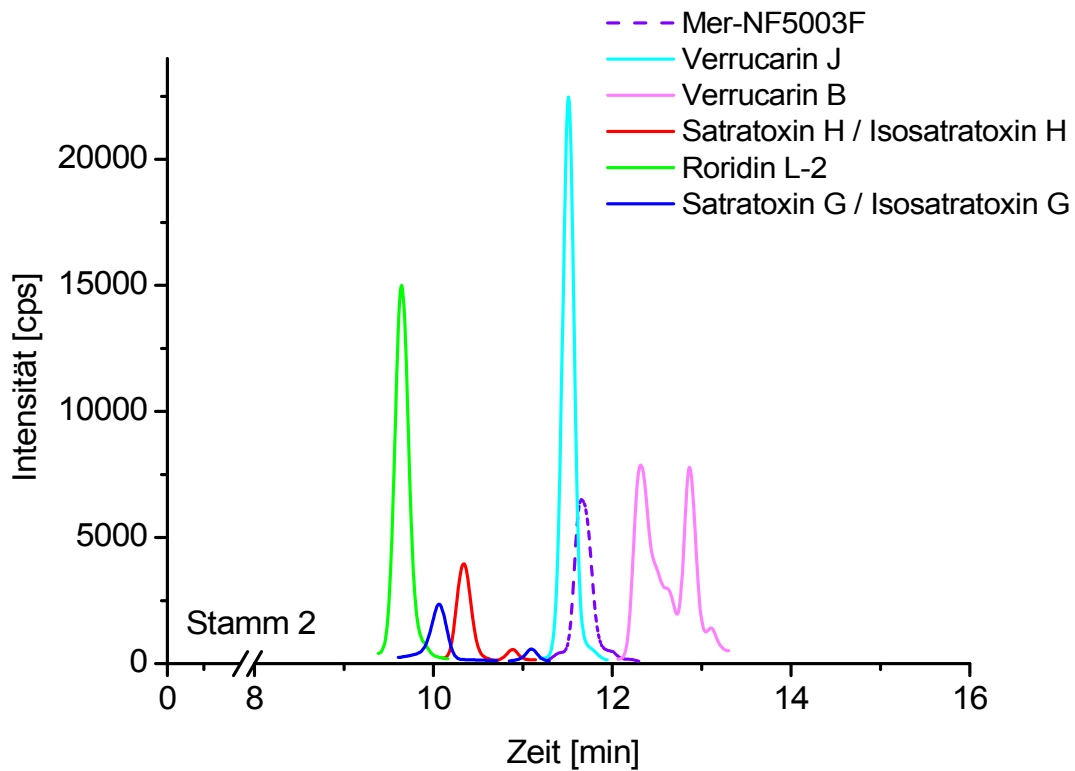


Abbildung 45: Chromatogramm der extrahierten Massenspuren für die identifizierten Mykotoxine in der Probe vom *Stachybotrys chartarum* Stamm S2

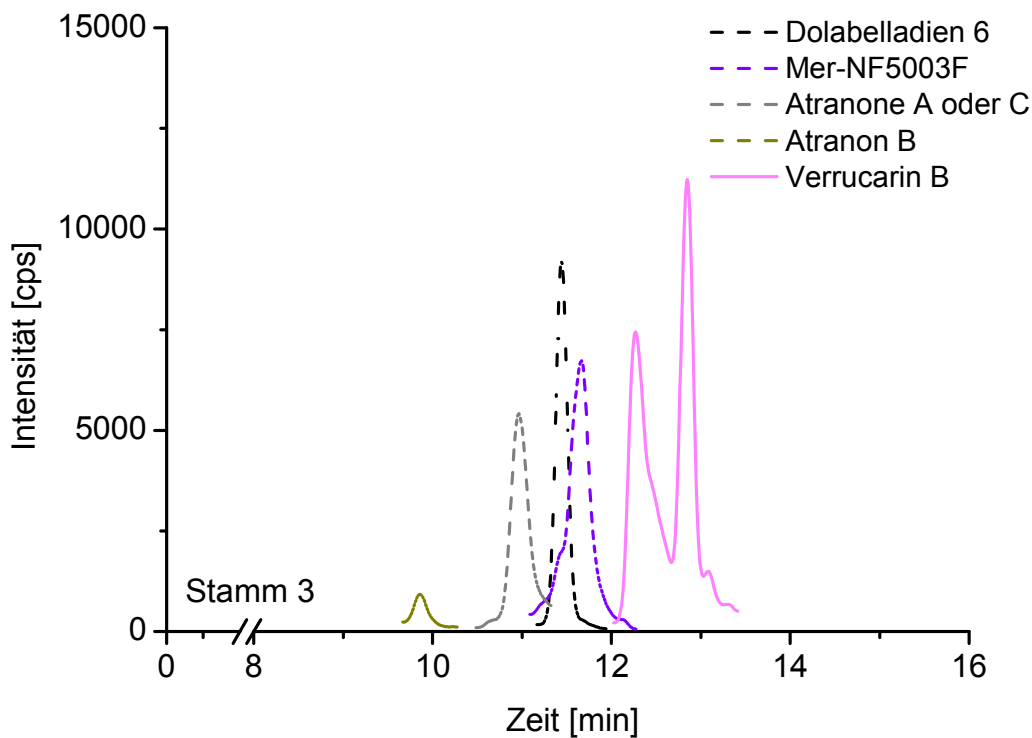


Abbildung 46: Chromatogramm der extrahierten Massenspuren für die identifizierten Mykotoxine in der Probe vom *Stachybotrys chartarum* Stamm S3

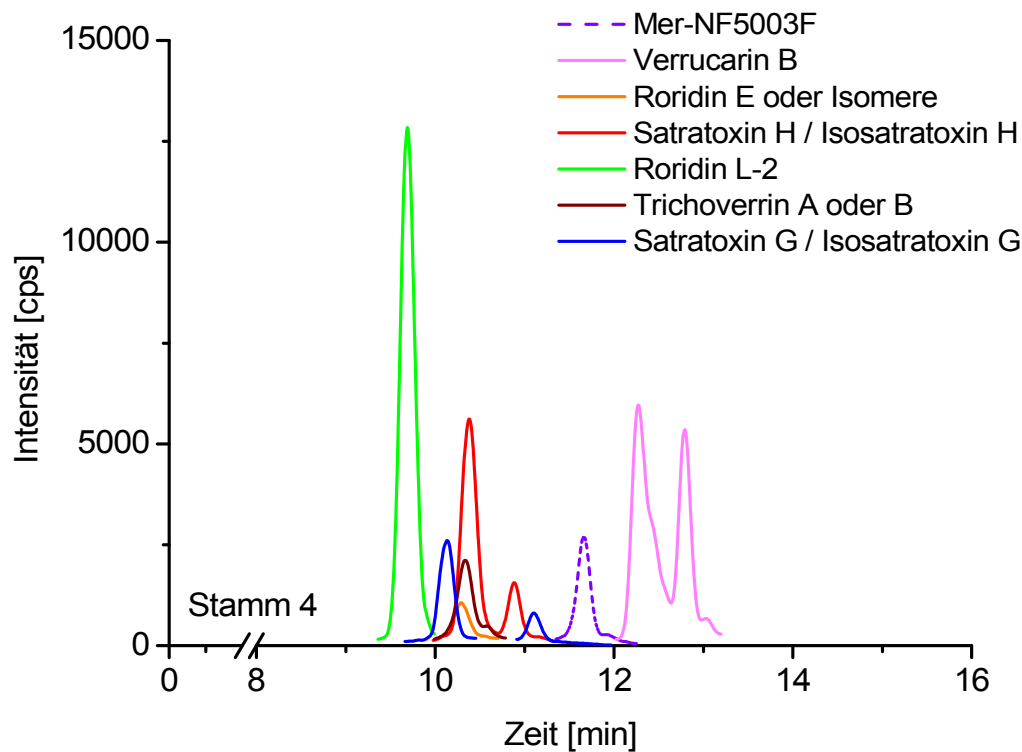


Abbildung 47: Chromatogramm der extrahierten Massenspuren für die identifizierten Mykotoxine in der Probe vom *Stachybotrys chartarum* Stamm S4

In der folgenden Tabelle 39 ist exemplarisch ein Vergleich der in dem Extrakt von Stamm S1 mit der Cap-LC-TOF-MS und der HPLC-QTOF-MS nachgewiesenen Mykotoxine dargestellt. Nicht mit jeder Methode konnten die gleichen Substanzen identifiziert werden. Verrucarin B konnte nicht mit der HPLC-QTOF-MS Methode nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden die Mykotoxine Atranon A oder C, Trichoverrin A oder B, sowie Iso-Satratoxin F nur mit dieser Kopplung anhand der Summenformeln bestätigt. Für Verrucarin B konnte die Summenformel  $C_{27}H_{32}O_9$  mit der Cap-LC-TOF-MS bestätigt werden, allerdings wurden in allen untersuchten Proben zwei Peaks erhalten.

Tabelle 39: Vergleich der mit der Cap-LC-TOF-MS und der HPLC-QTOF-MS in Stamm S1 nachgewiesenen Mykotoxine

Mykotoxin	Summenformel	Monoisotopische Masse [Da]	Massen-	Massen-	Massen-	Massen-
			abweichung	genauigkeit	abweichung	genauigkeit
			Cap-LC-TOF-MS [mDa]	Cap-LC-TOF-MS [ppm]	HPLC-QTOF-MS [mDa]	HPLC-QTOF-MS [ppm]
Mer NF5003F	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	386,2093	0,4	1,1	0,3	0,8
Atranon A oder C	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	416,2199	-	-	0,0	0,0
Verrucarin J	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	484,2097	0,2	0,4	0,1	0,3
Verrucarin B	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	500,2046	-5,1	-10,2	-	-
Roridin E oder Isomere	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	514,2567	0,2	0,3	0,1	0,1
Satratoxin H/ Isosatratoxin H	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>	528,2359	-3,5	-6,6	0,2	0,2
Roridin L-2	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	530,2516	8,0	15,1	-0,6	-1,1
Satratoxin G/ Isosatratoxin G	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	544,2308	3,1	5,7	-0,1	-0,1
Trichoverrin A oder B	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	532,2672	-	-	0,1	0,3
Isosatratoxin F	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	543,2250	-	-	0,4	0,7

Tabelle 40 zeigt den Vergleich der in dem Extrakt von Stamm 3 mit der Cap-LC-TOF-MS und der HPLC-QTOF-MS nachgewiesenen Mykotoxine. Auch hier konnten nicht mit jeder Methode die gleichen Substanzen identifiziert werden. Verrucarin B konnte nicht mit dem HPLC-QTOF-MS nachgewiesen werden. Stattdessen wurden Atranon F, G und H, sowie Trichoverrol A oder B anhand der Summenformel identifiziert.

Tabelle 40: Vergleich der mit der Cap-LC-TOF-MS und der HPLC-QTOF-MS in Stamm S3 nachgewiesenen Mykotoxine

Mykotoxin	Summenformel	Monoisotopische Masse [Da]	Massen-	Massen-	Massen-	Massen-
			abweichung Cap-LC-TOF-MS [mDa]	genauigkeit Cap-LC-TOF-MS [ppm]	abweichung HPLC-QTOF-MS [mDa]	genauigkeit HPLC-QTOF-MS [ppm]
Dolabelladien 6	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	302,2246	-4,3	-14,2	0,8	2,6
Atranon A oder C	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	446,2305	4,1	9,9	0,3	0,8
Atranon B	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	432,2148	-1,7	-3,8	0,0	-0,1
Atranon F	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	462,2253	-	-	0,5	1,1
Atranon H	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	404,2198	-	-	0,3	0,7
Atranon J	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	420,2148	-	-	-0,1	-0,2
Trichoverrol A oder B	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	484,2097	-	-	0,0	-0,1
Verrucaridin B	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	500,2046	-10	-20,0	-	-
Mer NF5003F	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	386,2093	5,4	14,0	-0,2	-0,5

Eine Untersuchung anderer Proben war nicht möglich, da die verwendeten Messgeräte nur für einzelne Messungen zur Verfügung standen.

#### **4.4 Produktionsverlauf der Toxine von *Stachybotrys chartarum***

Im folgenden Teil sind die Ergebnisse zur gezielten Produktion von Satratoxin G und H dargestellt. Da die Referenzsubstanzen kommerziell nicht verfügbar sind, wurden die untersuchten Mykotoxine nur halbquantitativ durch den direkten Vergleich der Peakflächen mit dem strukturverwandten Roridin A in den Proben bestimmt. Neben den Inkubationsbedingungen wurden auch unterschiedliche Wildstammisolate von *Stachybotrys chartarum* untersucht. Die Kultivierung wurde auf Festmedien durchgeführt, da bei Vorversuchen mit Flüssigkulturen deutlich niedrigere Gehalte an den Zielanalyten Satratoxin G und H in den Proben bestimmt wurden. Abbildung 48 zeigt den Wachstumsverlauf von *Stachybotrys chartarum* auf den beiden eingesetzten Nährmedien. In den Abbildung 49 bis Abbildung 56 sind graphisch die Produktionsverläufe als relative Mykotoxingehalte (Mykotoxin/Einwaage Feuchtgewicht [ng/g]) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer dargestellt. Tabelle 41 bis Tabelle 43 listen die maximalen Mykotoxinausbeuten auf. Bei einigen Stämmen war eine Probennahme in der sechsten Woche nicht mehr möglich, da keine weiteren Zellkulturflaschen zur Verfügung standen.

Nach dreiwöchiger Inkubation bei Raumtemperatur nimmt die Toxinbildung bei allen Stämmen zu, wobei die Stämme S1 und S4 deutlich weniger Toxine bilden, als die Stämme S1114, S1495 und S1624. Der Stamm S1495 bildete auf dem Kartoffelpüree-medium die höchste Menge an Satratoxin G. Bei den Mykotoxinen Satratoxin H, Trichoverrin A und B wurden die höchsten Gehalte auf Instantreisflocken bei Raumtemperatur von Stamm S1624 produziert. Beim Vergleich der verwendeten Nährmedien erwies sich der Einsatz des Kartoffelpüree-mediums insgesamt als weniger ertragsreich. Die Temperaturerniedrigung nach der dritten Woche, wie sie von Jarvis et al. beschrieben wurde (Jarvis et al. 1986), induzierte keine vermehrte Toxinproduktion.

Neben der Extraktion von Mycel und Medium, wurden auch in den durch Guttation gebildeten Tröpfchen auf dem Mycel geringe Konzentrationen von Satratoxin G (0,94 ng/mL) und H (0,83 ng/mL) in Vorversuchen nachweisen. Diese Exsudatabgabe wurde auch von Gareis beschrieben (Gareis et al. 2009).

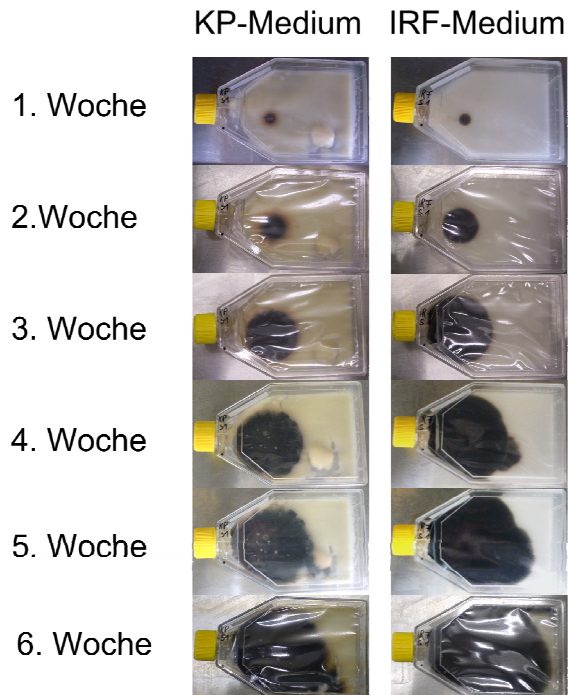


Abbildung 48: Wachstumsverlauf von *Stachybotrys chartarum* Stamm S1 auf den eingesetzten Nährmedien Kartoffelpüree (KP) und Instantreisflocken (IRF)

### Produktionsverlauf von Satratoxin G

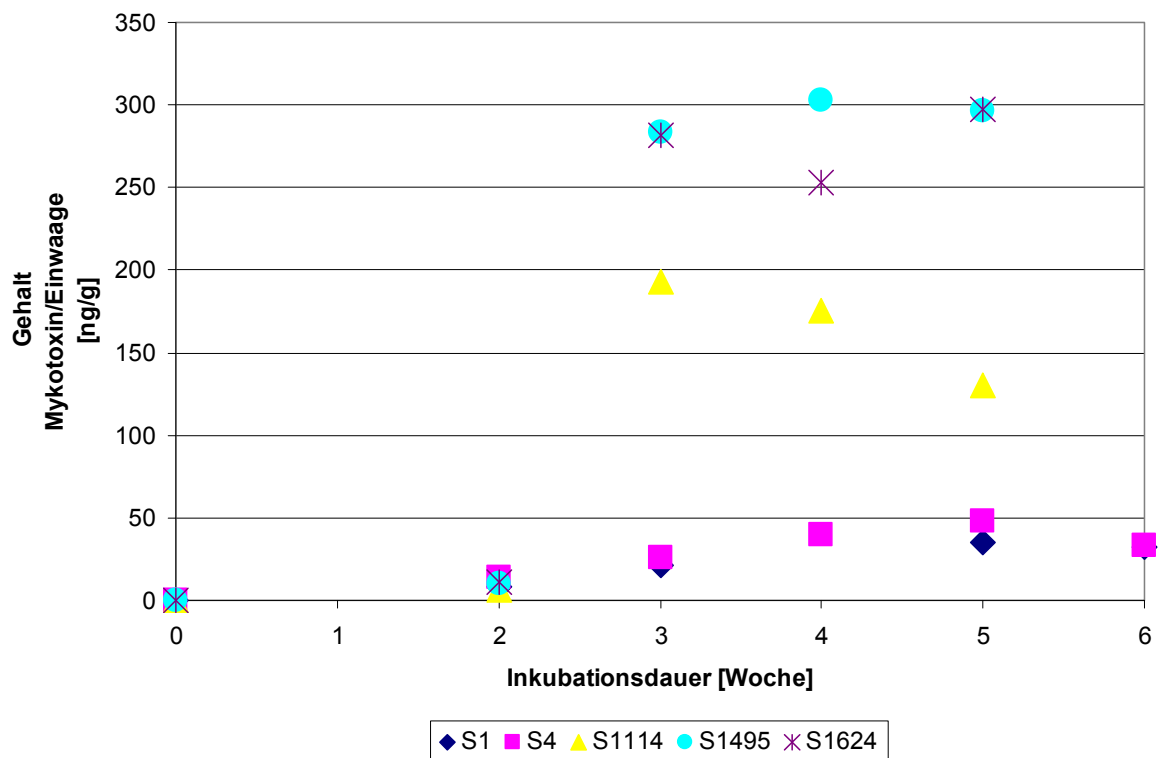


Abbildung 49: Produktionsverlauf von Satratoxin G für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme auf Instantreisflocken bei Raumtemperatur

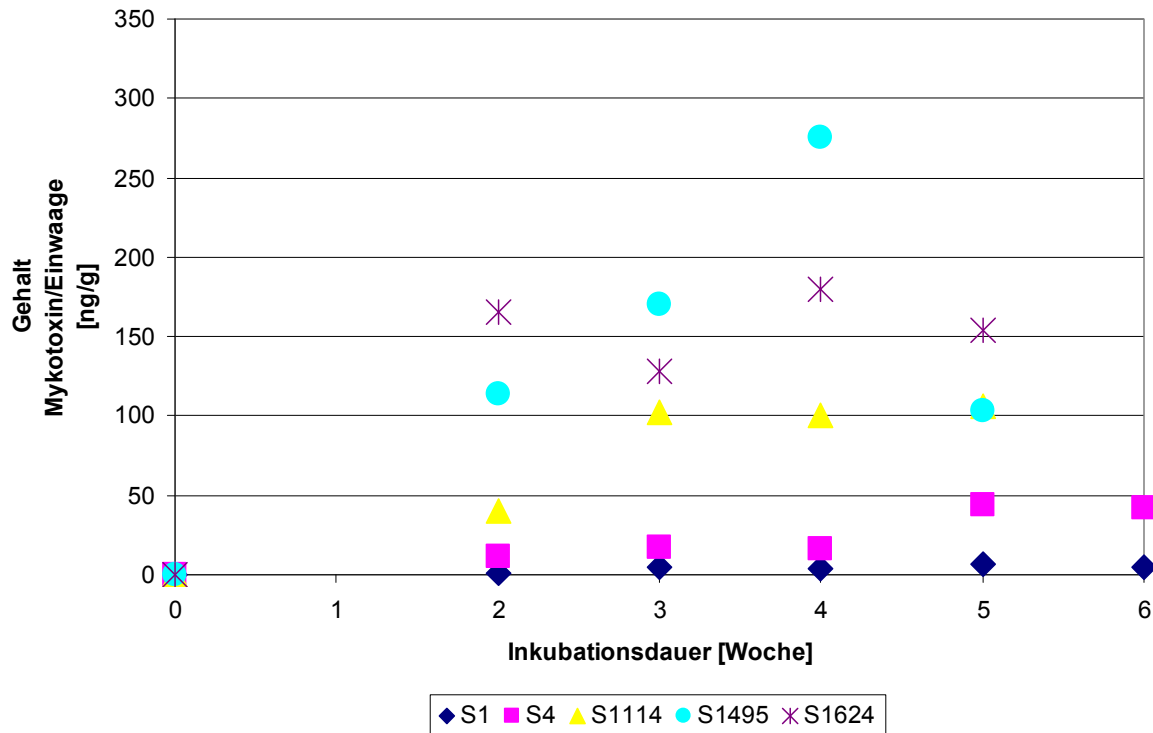


Abbildung 50: Produktionsverlauf von Satratoxin G für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme auf Kartoffelpüree bei Raumtemperatur

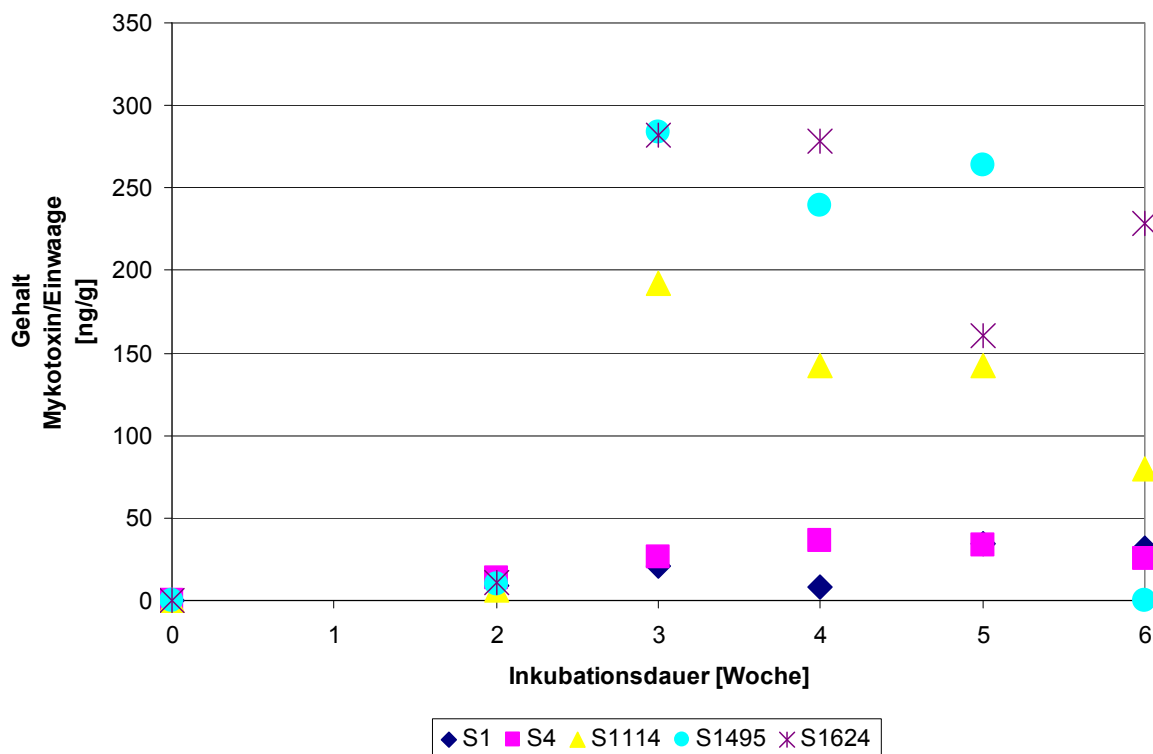


Abbildung 51: Produktionsverlauf von Satratoxin G für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme auf Instantreisflocken bei RT, nach 3. Woche bei 4°C



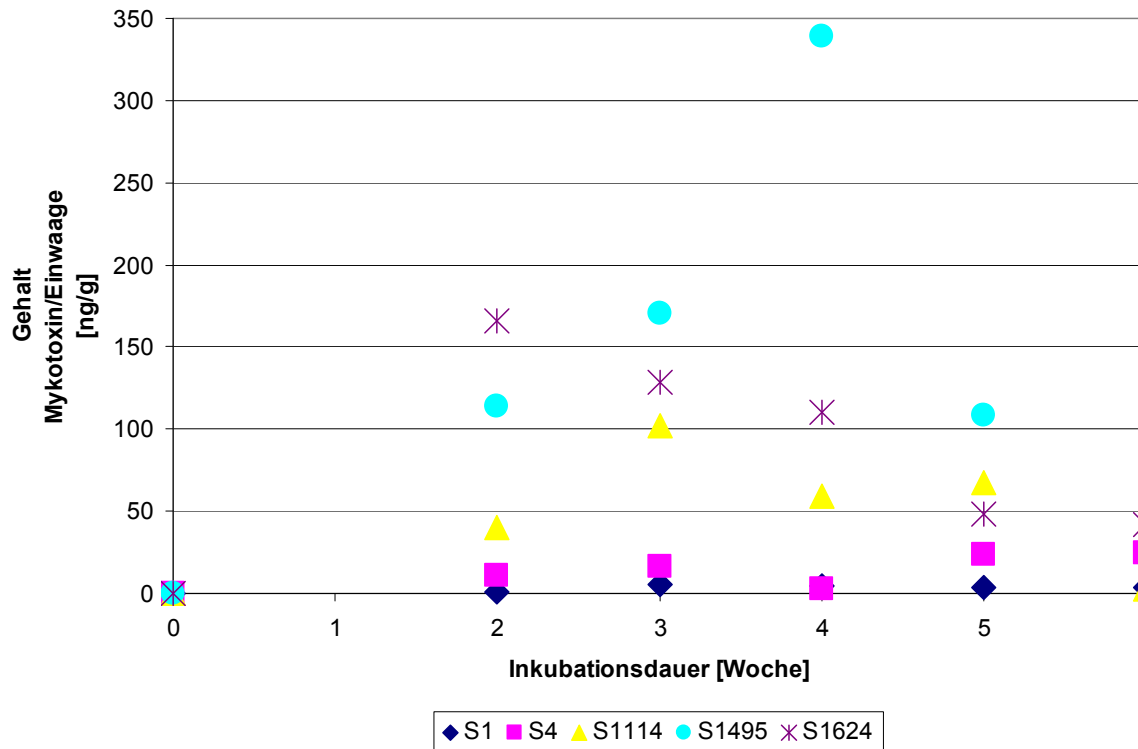


Abbildung 52: Produktionsverlauf für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme von Satratoxin G auf Kartoffelpüree bei RT, nach 3. Woche bei 4°C

Tabelle 41: Maximale Gehalte von Satratoxin G für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme in ng (Mykotoxin) / g (Einwaage Feuchtwicht) während der Inkubation auf IRF- und KP-Medium bei Raumtemperatur, nach 3. Woche bei 4°C

Stamm	Satratoxin G [ng/g] auf Instantreisflocken		Satratoxin G [ng/g] auf Kartoffelpüree	
	RT	nach 3. Woche bei 4 °C	RT	nach 3. Woche bei 4 °C
<b>S1</b>	35	34	7	5
<b>S4</b>	48	37	44	24
<b>S1114</b>	193	193	106	102
<b>S1495</b>	303	284	275	339
<b>S1624</b>	297	282	180	166

## Produktionsverlauf von Satratoxin H

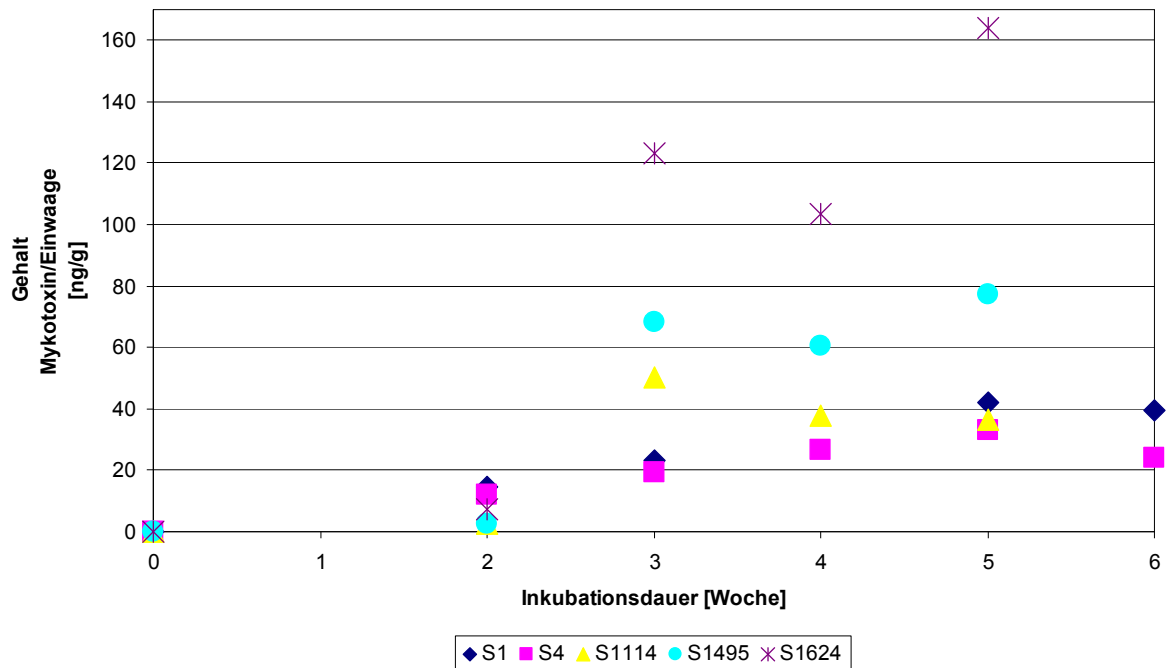


Abbildung 53: Produktionsverlauf von Satratoxin H für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme auf Instantreisflocken bei Raumtemperatur

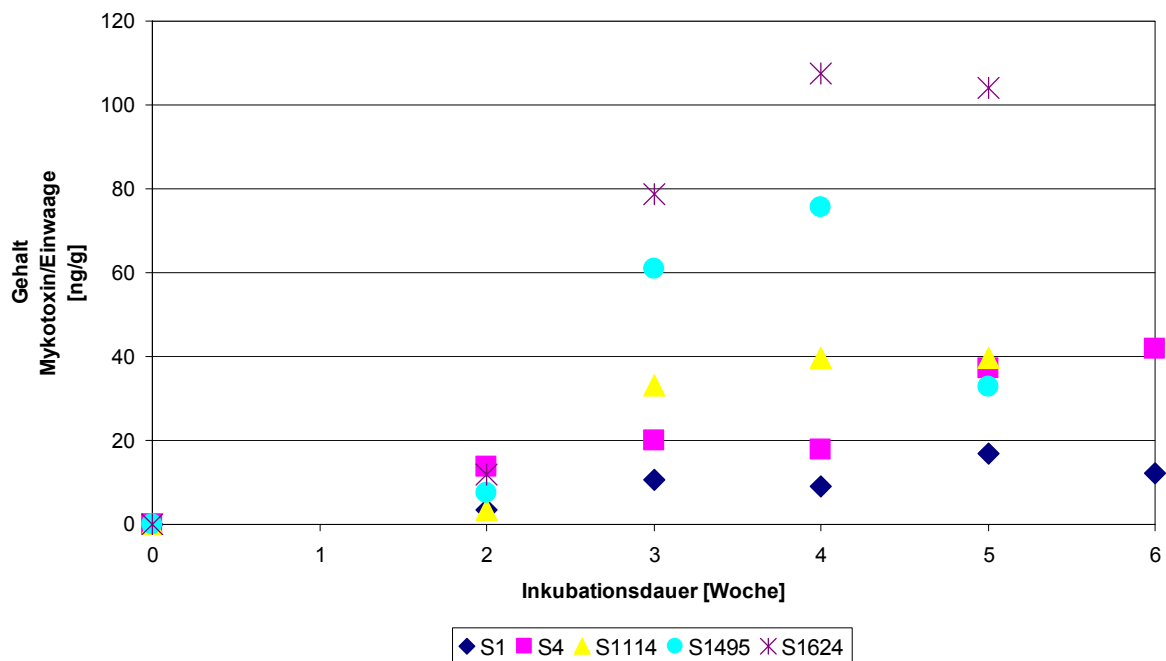


Abbildung 54: Produktionsverlauf von Satratoxin H für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme auf Kartoffelpüree bei Raumtemperatur

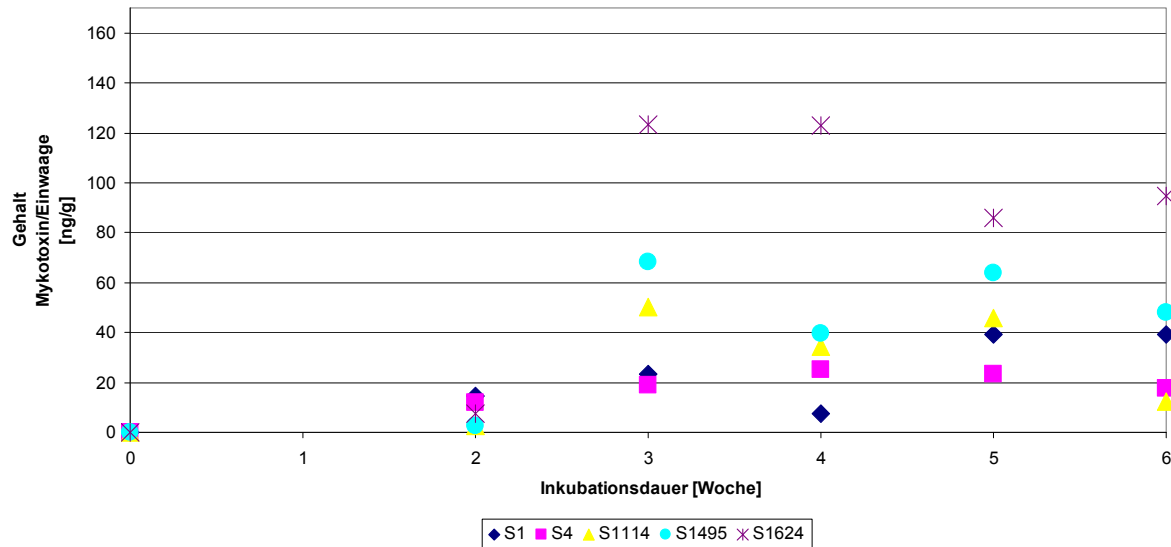


Abbildung 55: Produktionsverlauf von Satratoxin H für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme auf Instantreisflocken bei RT, nach 3. Woche bei 4°C

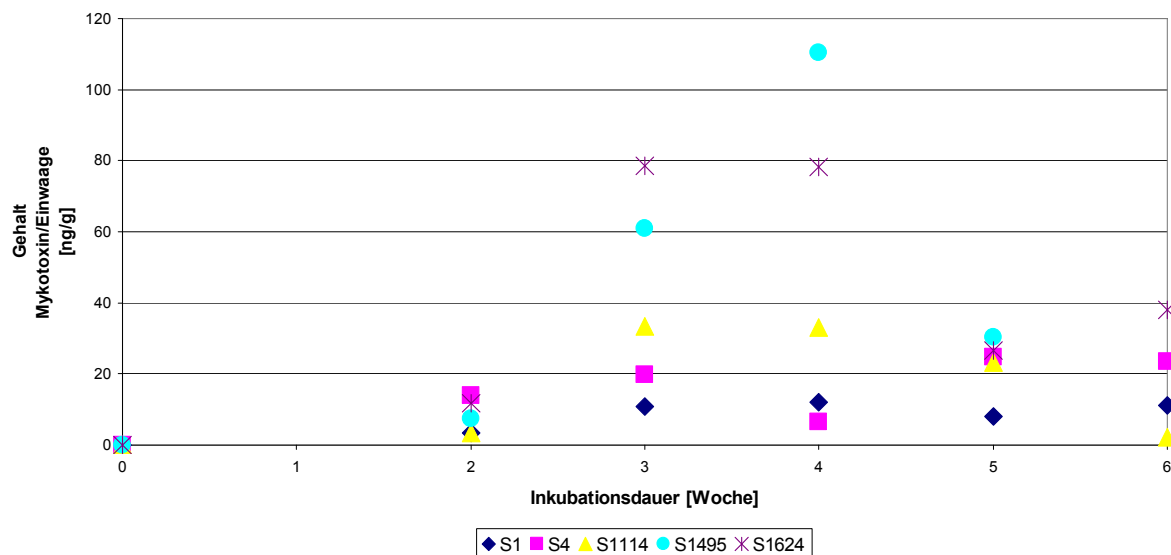


Abbildung 56: Produktionsverlauf für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme von Satratoxin H auf Kartoffelpüree bei RT, nach 3. Woche bei 4°C

Tabelle 42: Maximale Gehalte von Satratoxin H für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme in ng (Mykotoxin) / g (Einwaage Feuchtgewicht) während der Inkubation auf IRF- und KP-Medium bei Raumtemperatur, nach 3. Woche bei 4°C

Stamm	Satratoxin H [ng/g] auf Instantreisflocken		Satratoxin H [ng/g] auf Kartoffelpüree	
	RT	nach 3. Woche bei 4 °C	RT	nach 3. Woche bei 4 °C
S1	42	39	17	12
S4	33	25	42	25
S1114	50	50	40	33
S1495	77	68	76	110
S1624	164	123	108	79

### Produktion weiterer Trichothecene

Parallel zu den Satratoxinen wurden auch weitere Trichothecene wie Trichoverrin A und B (Tabelle 43) ausgewertet. Verglichen mit Satratoxin G und H wurden für diese Substanzen höhere Gehalte in den Proben gefunden. Dagegen konnten die Analyten Roridin L-2, Satratoxin F, Roridin E und seine Isomere nur in einzelnen Proben in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, weshalb für diese Substanzen kein Produktionsverlauf aufgezeichnet wurde.

Tabelle 43: Maximale Gehalte von Trichoverrin A und B für die untersuchten *Stachybotrys chartarum* Stämme in ng (Mykotoxin) / g (Einwaage Feuchtgewicht) während der Inkubation auf IRF- und KP-Medium bei Raumtemperatur, nach 3. Woche bei 4 °C

Stämme	Trichoverrin A und B [ng/g] auf Instantreisflocken		Trichoverrin A und B [ng/g] auf Kartoffelpüree	
	RT	nach 3. Woche bei 4 °C	RT	nach 3. Woche bei 4 °C
S1	229	217	45	31
S4	311	323	329	178
S1114	796	796	394	256
S1495	1.687	1.414	358	595
S1624	4.780	3.258	952	643

### Vergleich und Optimierung der Methoden zur Probenvorbereitung

Zur Methodvalidierung wurden die Wiederfindungsraten des zur halbquantitativen Auswertung eingesetzten Roridin A-Standards durch dotieren der unbeimpften Nährmedien (200 ng/mL) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 44 zusammengestellt. Durchschnittlich wurden von dem zugegebenen Roridin A beim Kartoffelpüree-medium ca. 72 % und beim Instantreisflocken-medium ca. 78 % wieder gefunden.

Tabelle 44: Wiederfindungsraten von Roridin A für die beiden Nährmedien

Kartoffelpüree	Wiederfindungsrate [%]	Instantreisflocken	Wiederfindungsrate [%]
Mittelwert	71,5	Mittelwert	78,3
Standardabweichung	4,57	Standardabweichung	2,67

Es wurde ein Vergleich zwischen den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Probenvorbereitungsmethoden mit und ohne Festphasenextraktion (PEI) durchgeführt. Hierfür wurden die Wildstammisolate S1 und S4 nach der in Kapitel 3.4.1. beschriebenen Methode zur Methodenentwicklung kultiviert. Zusätzlich wurden für den Stamm S1 zwei verschiedene Produktionschargen verglichen. Die Wiederfindungsraten bezogen auf Satratoxin G und H lagen ohne die Festphasenanreicherung zwischen 7 und 63 % niedriger (Abbildung 57 und Abbildung 58). Weder bei der Probenaufgabe noch bei der 2. Elution des Festphasenmaterials konnten Satratoxin G und H in den Eluaten nachgewiesen werden.

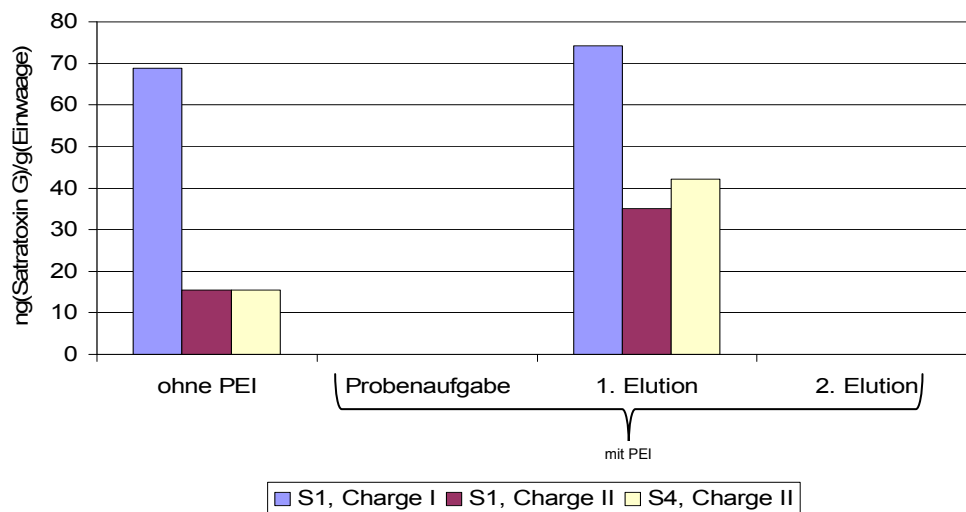


Abbildung 57: Vergleich der Probenvorbereitungsmethoden mit und ohne Festphasenanreicherung am Beispiel von Satratoxin G

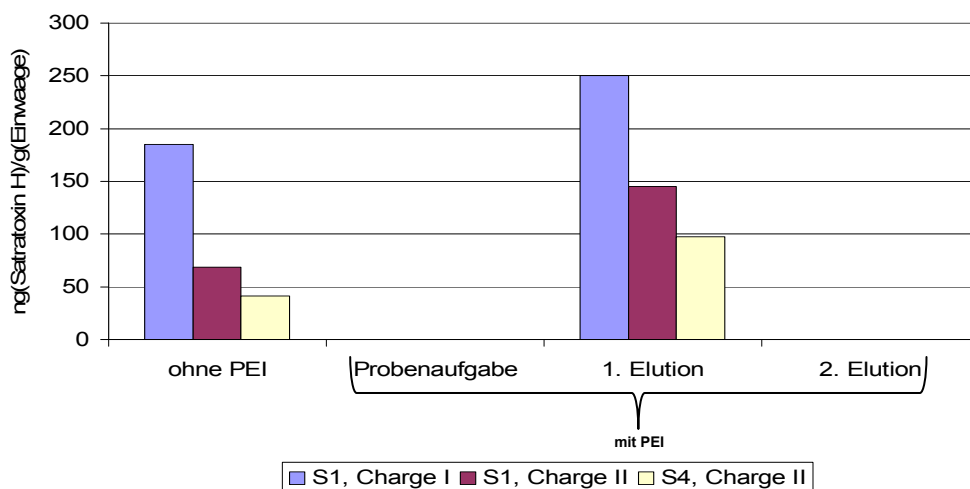


Abbildung 58: Vergleich der Probenvorbereitungsmethoden mit und ohne Festphasenanreicherung am Beispiel von Satratoxin H

## 5 Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die dargestellten Ergebnisse diskutiert und die Schlussfolgerungen zusammengefasst.

### 5.1 *Methodenentwicklung und Optimierung*

Analytische Nachweismethoden sollen richtig, präzise und robust sein. Diese Leistungskriterien und die daraus resultierenden Anforderungen an eine Methodenvvalidierung werden in der Literatur beschrieben (EU-Kommission 2002, Steck und Cammann 2006). Eine besondere Herausforderung ist die Optimierung von Multimetoden, da hier ein Kompromiss für Substanzen mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften gefunden werden muss. Für die Entwicklung von LC-MS Methoden besteht die Schwierigkeit geeignete Bedingungen für die Extraktion, die chromatographische Trennung und die Detektion zu finden (Sulyok et al. 2007b).

In Kapitel 3.5 sind die entwickelten und optimierten LC-MS Methoden dargestellt. Einzelne Ergebnisse der systematischen Methodenentwicklung sind in Kapitel 4.1 beschrieben.

#### 5.1.1 *Auswahl der spezifischen MRM-Übergänge*

Für einen sensitiven und selektiven Analytnachweis mittels Massenspektrometrie sind eine hohe Ionenausbeute und ein gutes S/N entscheidend. Für die Quantifizierung wird bei der Tandemmassenspektrometrie meist der MRM-Modus eingesetzt. Am Beispiel von DON ist die Auswahl der spezifischen MRM-Übergänge dargestellt (Abbildung 25 und Abbildung 26, Seite 49 und 50). Die Analytionen wurden mit ESI erzeugt, da sich DON mit APCI nur sehr schlecht ionisieren ließ. Für die anderen Mykotoxine wurden mit APCI auch nur unbefriedigende S/N im Vergleich zu ESI erhalten, deshalb wurde mit diesem Interface nicht weitergearbeitet. Auch Lagana et al. (2003) und Feldmann et al. (2003) erzielten für den Nachweis von Trichothecenen

mit ESI bessere Ergebnisse als mit APCI. Neben der Auswahl und Optimierung der Ionenquelle ist auch die Auswahl der MRM-Übergänge wichtig, wie das im Ergebnisteil dargestellte Beispiel für DON zeigt (Abbildung 25 und Abbildung 26, Seite 49 und 50). Das DON-Acetataddukt  $355\ m/z$  ( $[M-H+CH_3COOH]^-$ ) hatte die höchste Intensität, allerdings waren die S/N bei den Produktionen  $59\ m/z$  ( $[CH_3COO]^-$ ) und  $295\ m/z$  ( $[M-H-CH_3COOH]^-$ ) deutlich schlechter wie bei  $265\ m/z$  ( $[M-H-CH_2O]^-$ ). Sowohl die Bildung von Adduktionen, als auch das Fragmentierungsmuster wird von Songsermsakul und Razzazi-Fazeli (2008) und Feldmann et al (2003) bei der Analyse von Trichothecenen beschrieben. Die in Kapitel 4.1 dargestellten Ergebnisse für die Produktionen von DON  $59\ m/z$  und  $295\ m/z$  zeigen ein hohes Rauschen. Relativ unspezifische Produktionen wie das Acetation ( $59\ m/z$ ) lassen die Basislinie ansteigen und sollten nicht zur Quantifizierung ausgewählt werden (Klotzel et al. 2005, Sulyok et al. 2007b). Durch die Optimierung der Methode ließ sich das S/N für den Übergang  $355\ m/z$  zu  $265\ m/z$  um den Faktor 14 steigern. Die Auswahl des deprotonierten Vorläufers von DON ( $295\ m/z$ ) verringerte das Rauschen und auch die Identifizierung des Analyten konnte verbessert werden, da die bestimmten Produktionen  $265\ m/z$  und  $138\ m/z$  spezifisch für die chemische Struktur von DON sind.

### 5.1.2 Selektivität/Spezifität

Wie an dem Beispiel von DON gezeigt, ist die Selektivität der Nachweismethode wichtig, da in der Probe isobare Matrixbestandteile das Messsignal im MS stören können und damit das Rauschen erhöhen. Dies wird auch am Beispiel für Aflatoxin B1 deutlich (Abbildung 27-29, Seite 51-53). Im dargestellten Totalionenchromatogramm einer mit  $40\ ng/mL$  dotierten Poolstaubprobe waren keine eindeutigen Peaks zu erkennen. Im extrahierten EMS-Chromatogramm für die Massenspur  $313\ m/z$  war zur Retentionszeit der Referenzsubstanz bei  $4,4\ min$  kein Peak vorhanden, stattdessen waren zwei Peaks von Matrixkomponenten bei  $6,5$  und  $12,3\ min$  zu erkennen. Das MRM-Chromatogramm für Aflatoxin B1 mit dem Vorläuferion  $313\ m/z$  und den beiden Produktionen  $285\ m/z$  und  $128\ m/z$  zeigte einen Peak für die Referenzsubstanz bei  $4,4\ min$  bei beiden Massenspuren. Die ausgewählten Produktionen für Aflatoxin B1 werden auch von Sulyok et al. (2007a) als die intensivsten beschrieben. Nur bei  $128\ m/z$  ist ein weiterer Peak bei  $6,5\ min$  durch eine Matrixkomponente

im Hausstaubextrakt zu erkennen. Das wichtigste Unterscheidungskriterium ist neben der späteren Elution, das von der Referenzsubstanz Aflatoxin B1 abweichende Fragmentierungsmuster für diesen Störstoff. Bei einer Co-elution von Matrixkomponenten mit der Referenzsubstanz und der Verwendung eines Suchlaufmodus oder nur eines Massenübergangs würde dies zu einem falschen Ergebnis führen. Für die Analyse von Spurenstoffen in Umweltproben eignet sich der MRM-Modus von Tandemmassenspektrometern zur empfindlichen Quantifizierung, während mit der hochauflösenden MS auch eine Identifizierung von Unbekannten möglich ist (Krauss et al. 2010).

### **5.1.3 Matrixeffekte**

Neben den Bestandteilen einer Probe können auch Verunreinigungen aus den verwendeten Lösemitteln und Materialien einen Einfluss auf die Ionisierung bei der LC-MS haben. „Die Wirkung von co-eluierenden Verunreinigungen auf das Signal des Analyten, und damit auf die Genauigkeit der Ergebnisse, ist dem Analytiker häufig nicht bekannt“ (Herath et al. 2010). Diese Matrixeffekte werden verstärkt bei kompetitiven Ionisierungstechniken wie ESI beobachtet (King et al. 2000, Gosetti et al. 2010). Hierbei liegen die Analyten schon in den Flüssigkeitströpfchen ionisiert vor, während bei APCI die Analytmoleküle erst in der Gasphase ionisiert werden. Neben der Verringerung der Ionenausbeute durch andere Substanzen, kann auch eine Signalerhöhung auftreten (Gosetti et al. 2010). Diese Einflüsse können mit verschiedenen Verfahren bestimmt werden (Bonfiglio et al. 1999, Matuszewski et al. 2003). In dem in Kapitel 4.1 gezeigten Beispiel (Abbildung 30, Seite 54) konnten die Matrixeffekten durch die Infusion von Referenzstandards nach der chromatographischen Trennsäule visuell als „Matrixeffektchromatogramm“ dargestellt werden (Cole 2010). Die polaren Matrixbestandteile, die von der stationären Phase nicht zurückgehalten wurden, unterdrückten das Messsignal vollständig. Mögliche Erklärungen sind die Störung der Ionisierung durch nicht flüchtige Komponenten in den Tröpfchen (King et al. 2000) bzw. eine Veränderung der Viskosität und der Oberflächenspannung der Flüssigkeitströpfchen durch hydrophobe Matrixbestandteile, die generell einen höheren ESI Response aufzeigen (Cech und Enke 2001). Eine Signalerhöhung durch Komponenten in der Probenmatrix für einen Analyten konnte nicht beobachtet werden. Nur bei



einer Massenspur (Q1: 313  $m/z$  – Q3: 128  $m/z$ ) wurde bei Aflatoxin B1 ein höherer ESI-Response ermittelt. Dieser Störpeak wurde durch eine Matrixkomponente verursacht, die ein ähnliches Fragmentierungsmuster hatte, aber erst nach der Referenzsubstanz eluierte. Mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie wurde eine vom Aflatoxin B1 abweichende Summenformel bestimmt, die mit dem Weichmacher Butylbenzylphthalat übereinstimmt. Diese Substanz findet Anwendung in Nitrolacken sowie Kunststoffen und kann sich im Hausstaub anreichern, dies belegt der Referenzwert für Hausstaub von 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Butte et al. 2001). Ein negativer Einfluss auf die entwickelte Messmethode zur Quantifizierung konnte nicht beobachtet werden, da das Signal nur bei einer Massenspur beobachtet wurde und eine andere Retentionszeit hatte.

Neben den Retentionszeiten ist das wichtigste Identifikationsmerkmal für die analysierten Mykotoxine bei allen Messung mit dem Hybridmassenspektrometer die Bestimmung von zwei verschiedenen Produktionen pro Analyt (EU-Kommission 2002). Das gezeigte Beispiel belegt die Notwendigkeit einer eindeutigen Zuordnung eines Messsignals zu einem Analyten. Deshalb wurden alle Messungen mit dem Hybridmassenspektrometer im MRM-Modus durchgeführt.

#### **5.1.4 Vergleich verschiedener organischer Lösemittel**

Die Selektivität von chromatographischen Trennverfahren ist für die Methodenentwicklung der wichtigste Faktor, um die Substanzen in komplexen Proben separieren zu können (Neue 2007, Neue und Mendez 2007). Diese lässt sich im Wesentlichen durch Variation der mobilen Phase, des pH-Werts, der Temperatur oder der stationären Phase optimieren (Snyder und Kirkland 1979, Wilson et al. 2002a, Wilson et al. 2002b, Wilson et al. 2002c, Wilson et al. 2004). In Kapitel 4.1 sind die Ergebnisse zum Vergleich der Elutionsreihenfolge und Ionisierungseffizienz für acht ausgewählte Mykotoxine bei Verwendung von verschiedenen organischen Lösemitteln dargestellt (Abbildung 31, Seite 56). Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung alternativer Lösemittel wie Aceton, Tetrahydrofuran, Isopropanol und Ethanol, im Vergleich zu den klassischen Lösemitteln Methanol und Acetonitril, signifikante Änderungen zur Optimierung von chromatographischen Trennverfahren liefern kann. Da viele der untersuchten binären Lösemittelsysteme bei Raumtemperatur eine hohe

Viskosität aufweisen, wurde die Trennsäule auf 70°C temperiert. 2-Propanol hatte die höchste Elutionskraft, während mit Methanol die längsten Analysezeiten wegen der geringen Elutionskraft beobachtet wurden. Das Co-Solvens beeinflusste die Elutionsreihenfolge der acht Mykotoxine gravierend. So eluierte Citrinin bei Verwendung der Alkohole Methanol, Ethanol und 2-Propanol als Co-Solvens als letzte Komponente, während bei Aceton, Tetrahydrofuran oder Acetonitril durch die geänderte Selektivität Sterigmatocystin später als Citrinin eluierte. Ochratoxin A eluiert mit Aceton, Tetrahydrofuran und Ethanol nach Sterigmatocystin.

Der hohe UV-cutoff einiger Lösemittel spielt bei massenspektrometrischen Detektoren keine Rolle. Bei der MS ist für einen empfindlichen Nachweis eine hohe Ionenausbeute wichtig. Sterigmatocystin zeigte mit Tetrahydrofuran den höchsten Response, wohingegen die höheren Alkohole Ethanol und 2-Propanol die geringste Intensität zeigten. Da die Parameter der Ionenquelle immer ein Kompromiss bei Multianalytmethoden sind, wurden diese nicht verändert. Durch diese konstanten Bedingungen ist der Einfluss des organischen Lösemittels deutlich zu erkennen. Die bei der LC-MS Kopplung häufig verwendeten Lösemittel Methanol und Acetonitril zeigten insgesamt die besten Ergebnisse in Bezug auf die Sensitivität und in Bezug auf die Selektivität der Trennung für den Multikomponentenmix. Allerdings lassen sich durch den einfachen Wechsel des organischen Lösemittels kritische Peakpaare chromatographisch trennen oder die Empfindlichkeit gezielt verbessern (Teutenberg et al. 2008). Eine andere Möglichkeit zur Änderung der Selektivität ist die Phasenoptimierte HPLC, bei der mit unterschiedlichem Packungsmaterial befüllte Säulensegmente miteinander totvolumenfrei gekoppelt werden (Nyiredy et al. 1991, Nyiredy et al. 2007). Die Elution erfolgt in der Regel unter isokratischen Bedingungen. Für umweltanalytische LC-MS/MS Methoden wurde zur Reduzierung der Analysenzeit auch ein Lösemittelgradient verwendet (Zedda et al. 2009).

### **5.1.5 Schlussfolgerungen zur Methodenentwicklung und Optimierung**

Bei massenspektrometrischen Nachweisverfahren ist wegen der hohen Selektivität und Spezifität der Messtechnik eine eindeutige Identifizierung möglich (van der Heeft et al. 2009). Allerdings müssen auch bei einer Co-elution von Analyten und Matrixbe-

standteilen die Einflüsse auf die Bestimmung überprüft werden (Van Eeckhaut et al. 2009).

Wie gezeigt werden konnte, ist die Auswahl von selektiven und sensitiven Massenübergängen bei der Verwendung der Tandemmassenspektrometrie ein wichtiger Faktor bei der Methodenentwicklung. Der zur Quantifizierung von Mykotoxinen mit dem Hybridmassenspektrometer verwendete MRM Modus ist, wegen der besseren Selektivität und Spezifität gegenüber einem Suchlaufmodus, für eine Identifizierung und Quantifizierung vorzuziehen. Das belegt auch die geringere Anzahl der Identifikationspunkte, die bei der hochauflösenden MS, im Vergleich zu MRM-Methoden durch die Europäische Kommission in der Richtlinie zur Bestimmung von Kontaminationen in Lebens- und Futtermitteln, anerkannt werden (EU-Kommission 2002). Auf der anderen Seite gibt es auch Limitierungen bei MRM-Multimethoden. Dieser Messmodus kann nur bei bekanntem Fragmentierungsmuster verwendet werden und ist deshalb für Screening-Untersuchungen zur Suche nach neuen Substanzen nicht einsetzbar. Darüber hinaus gibt es auch technische Begrenzungen bei der Detektion mit einem MS. Ein Polaritätswechsel ist wegen langer Umschaltzeiten zwischen positiver und negativer Ionisierung nicht sinnvoll, da dies zu längeren Messzyklen und somit zu weniger Datenpunkten für den Peak führen würde. Deshalb wurden für die Hausstaubuntersuchung mit dem Hybridmassenspektrometer zwei getrennte LC-Messläufe verwendet. Auch bei anderen Multimethoden wurde diese Vorgehensweise und die damit verbundene Verdoppelung der Analysenzeit angewendet (Sulyok et al. 2006, Sulyok et al. 2007a, Hintikka und Holopainen 2009). Zusätzlich wurden die Verweilzeiten für die einzelnen MS-Experimente individuell optimiert, da sich bei sehr kurzen Zeiten (Dwell time) das S/N verschlechtert. Eine Möglichkeit bietet die von Vishwanath et al. (2009) für eine Multimethode genutzte Vorgehensweise, bei der die MRM-Experimente nur innerhalb einer Zeitspanne in Abhängigkeit von der Retentionszeit des Analyten gemessen wurden. Mit diesem neuen Messmodus wäre die gezeigte isobare Interferenz bei Aflatoxin B1 nicht direkt, sondern erst bei den Experimenten zur Visualisierung von Matrixeffekten aufgefallen. Die in meiner Arbeit festgestellte vollständige Ionensuppression aller Mykotoxine zur Systemdurchflusszeit der HPLC, zeigt die Notwendigkeit einer ausreichenden Retention der Analyten. Wie gezeigt werden konnte, wurde die Selektivität der chromatographischen Methode gezielt optimiert. Um störende Matrixeffekte durch co-eluierende Substanzen zu minimieren und dennoch alle Analyten in einer vorgegebenen Zeit von der Säule zu eluie-

ren, wurden die Lösemittelgradienten mit Hilfe der Software Drylab (Molnar 2002) optimiert. Anders als bei der Detektion mittels UV ist beim MS eine vollständige chromatographische Trennung der Analyten, die gerade für physikalisch-chemisch ähnliche Substanzen bei Multimethoden schwierig ist, für einen selektiven Nachweis nicht zwingend erforderlich.

Generell stellen Multimethoden nur einen Kompromiss der analytischen Bedingungen dar (Sulyok et al. 2007b). Dies gilt besonders für die Bestimmung von Spurenstoffen wie den Mykotoxinen in sehr komplexen und heterogenen Probenmatrices wie Hausstaub. Die entwickelten Messmethoden wurden für die besonderen Anforderungen zur Bestimmung von Mykotoxinen in Materialien des Innenraumes optimiert. Hierbei stellte sich heraus, dass viele methodische, analyt- und matrixspezifische Parameter Einfluss auf die chromatographische Trennung und Detektion mittels MS haben können, die für diese Arbeit systematisch betrachtet wurden.

## **5.2 Quantitativer Nachweis von Mykotoxinen**

Die entwickelten analytischen Nachweisverfahren für Mykotoxine in Materialien des Innenraums wurden auf die in Kapitel 3.3 beschriebenen Proben angewendet. Die Ergebnisse der Auswertungen sind in dem Kapitel 4.2 dargestellt.

### **5.2.1 Methoden zur Quantifizierung von Mykotoxinen**

Für die Quantifizierung der acht ausgewählten Mykotoxine (Aflatoxin B1, Citrinin, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin) mittels HPLC-Hybridmassenspektrometrie wurden die analytischen Kenndaten nach DIN 32645 berechnet (DIN 2008). Die für die Hausstaubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$  berechneten Nachweisgrenzen der Mykotoxine lagen im unteren  $\mu\text{g/kg}$  Bereich. Die instrumentellen Nachweisgrenzen, bezogen auf die Konzentrationen der kleinsten Standardlösungen mit einem  $S/N \geq 3$  wurden für zwei verschiedene Massenspektrometer bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden hierbei die gleichen Eluenten und die gleiche chromatographische Trennsäule verwendet. Die Empfindlichkeit war bei dem verwendeten Hybridmassenspektrometer nur bei Citrinin besser. Hier konnte noch eine 25-fach niedrigere Konzentration im Vergleich zum Quadrupolflugzeitmassenspektrometer nachgewiesen werden. Diese sonst geringere Sensitivität spiegelt weniger die unterschiedlichen Messplattformen der Tandem- und Flugzeitmassenspektrometrie, sondern die technologischen Weiterentwicklungen bei der MS in den letzten Jahren wieder. Generell sind QqQ Geräte sensitiver als TOF oder QTOF-MS Instrumente (Petrovic et al. 2006, Dass 2007). Hernandez et al. (2004) beschreiben eine 10-fach besser Sensitivität bei einem Tandemmassenspektrometer gegenüber einem QTOF-MS für den Nachweis von Pestiziden in Wasserproben. Des Weiteren wird von den Autoren die höhere Anzahl von Identifikationspunkten bei MS/MS Experimenten mit einem QqQ Gerät hervorgehoben. Neben der besseren Selektivität wird, durch die analytspezifische Fragmentierung im MS/MS Modus, das S/N und damit die Sensitivität verbessert. Ein Vergleich der analytischen Kenndaten mit Werten aus der Literatur ist schwierig, da unterschiedliche Konzentrationsangaben, Berechnungsmethoden für die Nachweisgrenzen oder Analysenverfahren verwendet

wurden. Für Deoxynivalenol wurde bei dieser Arbeit eine Nachweisgrenze von 6 µg/kg bestimmt. Von Vishwanath et al. (2009) wurde mit 15 µg/kg Hausstaub bezogen auf eine dotierte, zur Rückstandsanalytik für Metalle zertifizierte, Hausstaubprobe als Referenzmaterial für DON eine höhere Nachweisgrenze angegeben. Bei den HPLC-MS/MS Messungen wurden von den Autoren das DON-Acetataddukt 355 *m/z* als Vorläuferion verwendet, welches bei meiner Arbeit verglichen mit dem deprotonierten Vorläuferion (295 *m/z*) ein schlechteres S/N zeigte (Kapitel 4.1). Für Sterigmatocystin wurde mittels der Dünnschichtchromatographie eine Nachweisgrenze von 7 µg/kg bestimmt (Toepfer 2010). Mit dem in meiner Arbeit entwickelten HPLC-MS/MS Nachweisverfahren wurde ein Wert von 1,4 µg/kg bei einer Wiederfindungsrate von 88,9 % erhalten. Engelhart et al. (2002) haben mit derselben Messtechnik bezogen auf die Hausstaubfraktion ≤ 355 µm eine vergleichbare Nachweisgrenze bestimmt, allerdings betrug die Wiederfindungsrate nur 33 %. Die Nachweisgrenze für Ochratoxin A wurde von mir mit 2,1 µg/kg mit einer Wiederfindungsrate von 73 % bestimmt. Von Hintikka und Holopainen (2009) wurden für die Bestimmung von OTA mittels HPLC-MS/MS in Staubproben aus Lüftungsanlagen eine Nachweisgrenze von 24 µg/kg angegeben. Toepfer beschreibt ein Einzelanalytverfahren für OTA im Hausstaub (≤ 63 µm) mit immunchemischer Aufreinigung und Detektion mittels HPLC-UV mit der einer Nachweisgrenze von 0,23 µg/kg und einer Wiederfindungsrate von 78,4 % (Toepfer 2010). Mit für die Lebensmittelanalytik entwickelten Enzymimmunoassays konnten von der Autorin eine Nachweisgrenze von 0,4 µg/kg und eine Wiederfindungsrate von 115,1 % bestimmt werden. Für dieses Testverfahren wurden Kreuzreaktionen durch starke Matrixeffekte beschrieben, die zu extremen Schwankungen führten (Toepfer 2010). Auch für die bei meiner Arbeit eingesetzte Bestimmung mittels HPLC-MS/MS wurden wie bereits in Kapitel 4.1 gezeigt, starke Matrixeffekte beobachtet. Die in Kapitel 4.2.1 dargestellten Ergebnisse zur Bestimmung der Matrixwiederfindungsraten verdeutlichen die starken Effekte durch die Störung der Ionisierung. Vishwanath et al. (2009) beschreiben eine deutlich stärkere Ionensuppression von teilweise über 50 % beim Nachweis von Mykotoxinen mittels HPLC-MS/MS durch die Matrix Hausstaub im Vergleich zu Baumaterialien. Die Matrixeffekte sind auf die sehr komplexe Zusammensetzung von organischen Komponenten zurückzuführen. Die heterogene Zusammensetzung von Hausstaubproben konnte auch an der Bestimmung der Glühverluste gezeigt werden (Kapitel 4.2.5). Ähnliche Glühverlustwerte wurden auch von Butte und Walker (1994) beschrieben.

Auf das Gesamtverfahren haben neben der Störung der Ionisierung bei der Analyse von Spurenstoffen wie Mykotoxinen in Hausstaub durch Matrixkomponenten, auch die große Oberfläche der Hausstaubpartikel und die damit verbundene chemisch-physikalische Interaktion der Analyten mit dieser einen großen Einfluss auf die Extraktionswiederfindungsraten (Engelhart et al. 2002). Dies konnte bei meiner Arbeit auch an den in Anlehnung an Matuszewski et al. (2003) bestimmten Wiederfindungsraten bestätigt werden.

### **5.2.2 Nachweis in Innenraummaterialien**

Für alle durchgeführten Hausstaubanalysen aus den drei Kollektiven (NLL-Proben, Schadensfall- und Kontrollproben), wurde Altstaub der Fraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$  eingesetzt. In den analysierten Hausstaubproben konnten vier der elf für die Methodenentwicklung ausgewählten Mykotoxin quantitativ und zwei qualitativ nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.3). Dabei wurde Sterigmatocystin insgesamt in 14 Proben und damit am häufigsten mit einer Konzentration von bis zu  $2.070 \mu\text{g/kg}$  nachgewiesen. Selbst der kleinste Wert von  $15 \mu\text{g/kg}$  liegt deutlich über der von Engelhart et al. (2002) für fall-induzierte Frischstaubproben  $\leq 355 \mu\text{m}$  beschriebenen Konzentration von maximal  $4 \mu\text{g/kg}$ . In mit Besen und Kehrblech gesammelten Staubproben aus durch den Wirbelsturm Kathrina überfluteten, nicht sanierten und nicht mehr bewohnten Haushalten wurde Sterigmatocystin mit einer maximalen Konzentration von  $28 \mu\text{g/kg}$  bestimmt (Bloom et al. 2009).

Ochratoxin A wurde von mir in vier Proben mit einem maximalen Gehalt von  $13 \mu\text{g/kg}$  nachgewiesen. Toepfer (2010) gibt für das von ihr mittels HPLC-UV untersuchte Kollektiv einen Höchstgehalt von  $23,9 \mu\text{g/kg}$  in der Hausstaubfraktion  $\leq 63 \mu\text{m}$  an. Kasel et al. (1999) untersuchten OTA mittels HPLC-UV in 14 Tage altem Frischstaub, gesiebt auf eine Fraktion  $\leq 250 \mu\text{m}$ . Das 95. Perzentil wurde mit  $3,81 \mu\text{g/kg}$  und das Maximum mit  $5,1 \mu\text{g/kg}$  angegeben. In abgelagertem Staub aus einem korrodierten Lüftungsschacht wurde OTA mittels HPLC-UV in einer Konzentration von  $1.582 \mu\text{g/kg}$  nachgewiesen (Richard et al. 1999). Bei der anschließenden Bestätigung mittels HPLC-MS wurde von den Autoren eine Konzentration von  $810 \mu\text{g/kg}$  in einem anderen Aliquot der extrahierten Probe bestimmt. Auch wenn mit den beiden Methoden sehr verschiedene Konzentrationen bestimmt wurde, so zeigt sich den-

noch, dass OTA in hohen Konzentration im Innenraum vorkommen kann. Neben dem Vorkommen von Mykotoxinen werden von Täubel et al. (2011) das gleichzeitige Vorkommen von Bakterientoxinen in Baustoffproben und in Staubproben  $\leq 1$  mm beschreiben.

Da die in der Literatur beschriebenen Staubproben sehr unterschiedlich gesammelt und auch unterschiedliche Fraktionen zur Analyse verwendet wurden, ist ein direkter Vergleich den von mir bestimmten Konzentrationen von Mykotoxinen in Altstaub  $\leq 63 \mu\text{m}$  nur bedingt möglich. Durch die einheitliche Sammlung und Probenvorbereitung konnten die NLL-Proben aus dem bevölkerungsrepräsentativen Kollektiv (Hoffmann et al. 2008) mit den selbst gesammelten Hausstaubproben (Portner et al. 2010, Toepfer 2010) verglichen werden. Die Anzahl der auf die von mir untersuchten Mykotoxine positiv getesteten Proben und die einzelnen Substanzen lassen keine deutlichen Unterschiede erkennen. Allerdings ist die Anzahl der positiven Treffer in den 500 analysierten NLL-Proben verglichen mit den 153 Schadensfall- und 201 Kontrollproben jeweils niedriger. Die selbst gesammelten Schadenfall- und Kontrollproben lassen sich in Bezug auf das Vorkommen von Mykotoxinen nicht unterscheiden. Das lässt den Schluss zu, dass vermutlich bei den Teilnehmern der Kontrollgruppe zwar kein direkt sichtbarer Schimmelpilzbefall im Wohnraum vorlag, aber ein verdeckter Befall nicht ausgeschlossen werden kann oder dass gänzlich andere zusätzliche Quellen für Mykotoxine im Innenraum in Betracht kommen. Möglich ist auch eine Verzerrung der Ergebnisse der Kontrollgruppe, da aktiv zur Studienteilnahme aufgerufen wurde und die Analysen kostenlos angeboten wurden.

Neben den Hausstaubproben wurden die von mir entwickelten Nachweisverfahren auch auf Baustoffproben angewendet. In einem Stück mit Schimmelpilzen befallener Tapete konnte Sterigmatocystin mit einer Konzentration  $509 \mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bestimmt werden. In von der Wand abgekratzten fallinduzierten Proben werden in der Literatur Konzentrationen von bis zu  $3.900 \mu\text{g}/\text{kg}$  angegeben (Vishwanath et al. 2009). Nielsen et al. (1999) beschreiben bei künstlich befallener Tapete Werte von bis zu  $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , bei natürlichem Schimmelpilzbefall lagen die Werte zwischen  $7 \text{ ng} - 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Prinzipiell kann es zu einer Anreicherung der Mykotoxine über Partikel oder Sporen und damit im Hausstaub kommen. Dies konnte für die befallene Tapetenprobe (Abbildung 32, Seite 64) allerdings nicht bestätigt werden. Der Hausstaub aus dieser Wohnung wurde vor und nach der Sanierung mehrfach analysiert. In allen vier Proben waren die Konzentrationen von Sterigmatocystin unterhalb der



Nachweisgrenze, obgleich teilweise eine erhöhte Konzentration von *Aspergillus versicolor* nachgewiesen wurde.

### **5.2.3 Auswertung der Fragebögen zu den selbst gesammelten Schadensfall- und Kontrollproben**

Beim Vergleich der Schadensfall- und Kontrollproben ist festzustellen, dass in den Fallproben deutlich höhere Konzentration an *Aspergillus versicolor* nachgewiesen wurden, während die höchste Konzentration von Sterigmatocystin in einer Kontrollprobe bestimmt wurde (Kapitel 4.2.4). In dem zur Probe erhobenen Fragebogen gab der Studienteilnehmer an, dass er keinen sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum hatte, wobei allerdings ein verdeckter Befall nicht auszuschließen ist. Die weitere Auswertung des Fragebogens lässt auch keine Rückschlüsse auf mögliche Quellen zu. Der 50 Tage alte Hausstaub wurde nur im Wohnraum gesammelt. Es gab bei der vierköpfigen Familie keinen früheren Schimmelpilzbefall im Wohnraum, keine Topfpflanzen oder eine Sammlung und Lagerung von Biomüll. Ob sich toxische Partikel oder Sporen von Außen z. B. über das Schuhwerk oder die Haltung eines Hundes in dem Hausstaub angereichert hatten, konnte nicht geklärt werden. In der Hausstaubprobe wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten untersucht. Der toxinbildende Schimmelpilz *Aspergillus versicolor* war in der Hausstaubprobe nur in geringer Konzentration kultivierbar. Verglichen mit den anderen Schadensfall- und Kontrollproben in denen Sterigmatocystin nachgewiesen wurde, zeigt sich, dass nicht immer der potentielle Toxinproduzent auch kultivierbar war und dass ein üppiges Schimmelpilzwachstum nicht eine hohe Toxinproduktion und umgekehrt bedeutet (Rolle-Kampczyk et al. 2001). Dass die Präsenz von potentiellen toxinbildenden Schimmelpilzen nicht immer mit den Toxinbefunden korreliert, wird auch von anderen Autoren in der Literatur beschrieben (Tuomi et al. 2000). Da Mykotoxine stabil und schwerflüchtig sind, können sie auch lange nach dem die Sporen ihre Lebensfähigkeit verloren haben nachgewiesen werden (Pitt et al. 2000). Auch für die beiden auf DON positiv getesteten Proben wurde ein ähnliches Ergebnis wie bei Sterigmatocystin erhalten. Nur in 50 % der Hausstaubproben konnten *Fusarien spp.* nachgewiesen werden. Ob so hohe Gehalte an DON in den Hausstaubproben durch das Aufsaugen z.B. von toxischen Lebens- oder Futtermitteln resultieren können, ist

fraglich. Zum einen wurden die Hausstaubproben schonend mit der Hand gesiebt, zum anderen tritt durch das Staubsaugen eine starke Verdünnung der kontaminierten Lebensmittel ein. Trotz der Vielzahl der mit den Fragebögen erhobenen Daten konnten keine signifikanten Einflussfaktoren auf den Toxingehalt oder Unterschiede in den Schadensfall- und Kontrollproben festgestellt werden.

#### **5.2.4 Schlussfolgerungen zum quantitativen Nachweis von Mykotoxinen**

Die entwickelten flüssigkeitschromatographischen Trennverfahren und massenspektrometrischen Detektionsmethoden zur Bestimmung von Mykotoxinen wurden an unterschiedlichen Hausstaub- und Baustoffproben erfolgreich angewendet. Hiermit ließen sich Mykotoxine in Materialien des Innenraums im spurenanalytischen Konzentrationsbereich nachweisen. Dabei wurden Sterigmatocystin, Deoxynivalenol und Ochratoxin A am häufigsten nachgewiesen. Trotz der einheitlichen und systematischen Versuchsplanung von der Probennahme bis zu den Analysemethoden, konnten anhand der Messdaten keine eindeutigen Unterschiede zwischen Haushalten mit und ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum festgestellt werden. Mit der Sammlung über einen längeren Zeitraum konnten sich schwerflüchtige Substanzen wie Mykotoxine im Altstaub anreichern, dennoch waren aufgrund der multifraktionell beeinflussten Zusammensetzung von Hausstaub Rückschlüsse auf die Quellen nicht möglich. Die auf Mykotoxine positiv getesteten Proben belegen das Vorkommen im Hausstaub, gleichzeitig ist dies auch ein Pfad der Exposition mit diesen Stoffen. Die Bestimmung der Toxinkonzentration in Materialproben ist für eine Gefährdungsbeurteilung nur bedingt geeignet. Das Vorkommen von Mykotoxinen im Staub von Lüftungsanlagen und die damit verbundenen Exposition der Bewohner wurde auch von Hintikka et al. (2009) beschrieben. Mayer et al. (2007b) beschreiben die Exposition durch toxische Stäube in Getreidelagern. Die gesundheitliche Relevanz wurde von den Autoren aufgrund fehlender Grenzwerte abgeschätzt. Sie schließen eine Gefährdung durch luftgetragene Mykotoxine nicht aus. „Wie hoch die mögliche Gesundheitsgefährdung durch inhalative oder dermale Aufnahme von Mykotoxinen zu bewerten ist, ist derzeit noch weitgehend unklar“ (Mayer et al. 2007a).

Die gesundheitliche Bewertung von Mykotoxinen im Hausstaub ist wegen fehlender Grenzwerte bzw. Bewertungsschemata schwierig. Über die Exposition mit Mykotoxi-

nen im Innenraum und die gesundheitlichen Folgen ist derzeit nur wenig bekannt (Bennett und Klich 2003). Sterigmatocystin wurde in vierzehn von mir untersuchten Hausstaubproben nachgewiesen. Es ist zytotoxischer als Aflatoxin B1 und kann in der Leber zu dem starken Kanzerogen 1,2-epoxy-Sterigmatocystin metabolisiert werden (Wang und Groopman 1999, Bunger et al. 2004). Cabaret et al. (2010) haben in vitro mit trachealen Epithelzellen von Schweinen eine verminderte Bildung des reaktiven Epoxyds festgestellt; allerdings ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane Zellen noch offen. Über den genauen Wirkungsmechanismus reiner Substanzen oder mögliche kombinatorische Effekte von Mykotoxinen mit anderen Substanzen ist bisher nur wenig bekannt.

Zur Exposition einer Person mit Mykotoxinen tragen verschiedene Expositionspfade nacheinander oder gleichzeitig bei. Diese können unterschiedlich hoch sein und stark variieren. Aus Vorsorgegründen ist das verstärkte Auftreten von mykotoxinproduzierenden Schimmelpilzarten im Innenraum kritisch zu bewerten (Moriske und Szewzyk 2002). Einen großen Einfluss auf die Innenraumexposition hat die Aufenthaltszeit in Gebäuden, die unter anderem vom Alter, dem Beruf und der Jahreszeit abhängig ist. Erwachsene in Deutschland halten sich im Winter zu ca. 90 % und im Sommer zu ca. 80 % der Zeit eines Tages in Gebäuden auf (Friedrich et al. 2001, Brasche und Bischof 2005). Kleinkinder verbringen noch mehr Zeit in Gebäuden. Ihre Exposition ist in zahlreichen Aspekten komplett anders als bei Erwachsenen (Paustenbach 2000). Zu den Unterschieden gehören insbesondere die Aktivitätsparameter wie z.B. ihre längere Aufenthaltszeit in Gebäuden und in Fußbodennähe, ihre Ernährung und ihr Metabolismus. Die Unterschiede zu Erwachsenen werden besonders deutlich, wenn die Parameter in Bezug zum Körpergewicht gesetzt werden. Damit ein Stoff im Hausstaub eine toxische Wirkung im Menschen bewirken kann, muss zusätzlich zu einer relevanten äußeren Exposition noch eine weitere Bedingung erfüllt sein: Der Stoff muss bioverfügbar sein, d.h. bei der Exposition die jeweilige biologische Grenzfläche durchdringen und anschließend an seinen toxikologischen Wirkort gelangen (innere Exposition). Die Exposition durch organische Stoffe im Hausstaub wurde von Ertl (2006) beschrieben. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden für die drei Expositionspfade Haut (dermal), Mund (digestiv) und Atemwege (inhalativ) und drei Expositionsszenarien (Kinder im Alter von 2 Jahren und 6 Jahren, sowie Erwachsene) jeweils der Gehalt eines Mykotoxins berechnet (Ertl et al. 2007), der den TDI-Wert (tolerable daily intake) der Europäischen Kommission allein über diesen Pfad voll-

ständig ausschöpft (EU-Commission 1998, 1999). Dabei wurde die kleinste berechnete Konzentration als Richtwert definiert. Von den drei häufigsten Toxinen im Hausstaub sind TDI-Werte nur für OTA mit 5 ng/kg Körpergewicht (EU-Commission 1998) und DON mit 1 µg/kg Körpergewicht beschrieben (EU-Commission 1999). Für Stenigmatocystin sind keine Werte vorhanden, da es zwar im Innenraum häufiger nachgewiesen werden kann aber für den reglementierten Bereich der Lebens- und Futtermittel keine Rolle spielt. Für diese theoretische Betrachtung ergibt sich bei dermalen Exposition von Kleinkindern für OTA ein Richtwert von 10 µg/kg Hausstaub. Für Erwachsene berechnete sich ein Wert von 30 µg/kg Hausstaub. Nach der Berechnung zur Exposition mit DON im Hausstaub lagen alle in den von mir gemessenen Konzentrationen deutlich unter den Richtwerten. Für eine vollständige Ausschöpfung des TDI-Wertes von DON durch eine Exposition mit Hausstaub, müsste schon die Konzentration bezogen auf die digestive Aufnahme bei Kleinkindern 40 mg/kg betragen. Die Werte für die anderen berechneten Szenarien liegen noch deutlich höher. Es zeigt sich aber insgesamt, dass Mykotoxine über den Hausstaub wenn auch in geringen Konzentrationen einen Beitrag zur chronischen Exposition leisten können. Für die weitere Aufklärung zum Vorkommen und zur Expositionsanalyse von Mykotoxinen im Innenraum sind weitere Forschungsarbeiten nötig. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist die Anwendung von standardisierten Probenahmeverfahren und Analysemethoden erforderlich (Mayer et al. 2008). Neben der Ergänzung der Quantifizierungsmethoden um weitere Analyten erfordert die beschränkte Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen und die Vielfalt noch unbekannter Metabolite hierzu auch die Übertragung der dargestellten Screeningmethoden zur Identifizierung von Mykotoxinen auf neue Substanzen. Darüber hinaus könnte die für den Bereich der forensisch toxikologischen Analytik beschriebene Methodik (Weinmann et al. 2001, Oberacher 2011) auch für Mykotoxine eingesetzt werden. Die mit der Tandemmassenspektrometrie ermittelten Produktionenspektren wurden von den Autoren in Bibliotheken zusammengeführt und können somit für Datenbankrecherchen genutzt werden. Mit einer Spektrenbibliothek für Mykotoxine und Metabolite wären bei ausreichend hohen Gehalten in der Probe eine schnelle und valide Identifizierung in Materialien des Innenraums in einer statistisch relevanten Anzahl an Proben möglich.

### **5.3 Qualitativer Nachweis von Mykotoxinen beim Fehlen von Referenzsubstanzen am Beispiel von *Stachybotrys chartarum***

Für ausgewählte Mykotoxine des Schimmelpilzes *Stachybotrys chartarum* sind Methoden zum qualitativen Nachweis mittels LC-MS beim Fehlen von Referenzsubstanzen entwickelt und angewandt worden. Im folgenden Abschnitt sind die einzelnen Methoden verglichen.

#### **5.3.1 Identifizierung von Mykotoxinen mittels Hybridmassenspektrometrie**

Mit den in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Methoden wurden Satratoxin G und H, Roridin L-2, sowie Trichoverrin A und B in den extrahierten Proben nachgewiesen (Kapitel 4.3.1). In dem Totalionenchromatogramm waren keine markanten Substanzpeaks direkt zu erkennen. Erst durch die Selektion diskreter Massenspuren waren, wie im Beispiel von Satratoxin H gezeigt, im Chromatogramm Peaks zu sehen (Abbildung 36, Seite 70). In dem dazu gehörenden Massenspektrum waren charakteristische Ionen, die auf den Analyten hinweisen können, zu erkennen (Abbildung 37, Seite 71). Das wichtigste Identifikationskriterium war bei diesem Massenspektrometer aufgrund der vorgegebenen Massenauflösung das Produktionenspektrum. Durch die Selektion und gezielte Fragmentierung war eine Interpretation und Beschreibung der chemischen Struktur möglich. In dem dargestellten Beispiel wurden vom protonierten Vorläuferion zwei charakteristische Produkte erzeugt (Abbildung 38, Seite 72). Die Ionen 249 und 231  $m/z$  wurden auch in der Literatur als Merkmal für das Terpengerüst von Trichothecenen genannt (Tuomi et al. 1998, Gottschalk et al. 2008). Ähnliche Produktionen wurden auch bei der Anwendung der MS-Fragmentierungssimulation mit der Software ACD-Labs erhalten. Für die Identifikation von Spurenstoffen in komplexen Mischungen, die auch isomere und oder isobare Substanzen enthalten, ist eine chromatographische Trennung erforderlich. Deshalb wurden für die Trennung verschiedene Kombinationen von Trennsäulen und Lösemittelsystemen eingesetzt. Sowohl mit der chromatographischen Methode zum qualitativen als auch zum quantitativen Nachweis mit der HPLC-Hybridmassenspektrometrie, wurden die

gleichen Ergebnisse erhalten. Unterschiede im Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch den Einsatz von Acetonitril oder Methanol wurden nicht beobachtet.

### **5.3.2 Identifizierung von Mykotoxinen mittels Flugzeitmassenspektrometrie**

Mit Hilfe der hochauflösenden Messmethoden der Flugzeitmassenspektrometrie wurde die in Kapitel 3.5.4 und 3.5.5 beispielhaft dargestellte Identifizierung von Mykotoxinen beim Fehlen von Referenzsubstanzen durchgeführt. Die Substanzen Satratoxin G, H und ihre Isomere konnten mit beiden chromatographischen Methoden getrennt werden. Sowohl die Auflösung der Peakpaare als auch die Elutionsreihenfolge sind sehr gut vergleichbar, obwohl unterschiedliche Trennsäulen und Eluenten verwendet wurden.

Die Identifikation der Analyten durch die Bestimmung der Summenformeln sind bei der Cap-LC-TOF-MS mit einer Massengenauigkeit für Satratoxin G von 5,7 ppm und für Satratoxin H mit einer Massengenauigkeit von -6,6 ppm als gut zu bezeichnen (Abbildung 40, Seite 74). Darüber hinaus war mit dem QTOF-MS zusätzlich auch eine Bestimmung der Summenformeln der Produktionen möglich. Die Vorläuferionen und die Produktionen konnten mit einer sehr guten Massengenauigkeit bestimmt werden (Abbildung 41-Abbildung 43, Seite 75 und 76) und bestätigen die Ergebnisse mit dem Hybridmassenspektrometer. Die in der Literatur von Gottschalk et al. (2008) und Tuomi et al. (1998) beschriebenen Produktionen für die Satratoxine wurden von den Autoren mit Massenspektrometern mit geringer Auflösung gemessen, allerdings konnten dort zur Methodenentwicklung Referenzsubstanzen eingesetzt werden.

### **5.3.3 Unterscheidung der Chemotypen von *Stachybotrys chartarum* anhand der Mykotoxinprofile**

Die Unterscheidung der Chemotypen S und A von *Stachybotrys chartarum* war auch ohne molekularbiologische Techniken durch den Nachweis der makrocyclischen Trichothecene in den Proben möglich. Dies konnte anhand der dargestellten Ergebnisse am Beispiel von Satratoxin G und H, sowie den Isomeren gezeigt werden. Diese

Mykotoxine wurden in den Wildstammisolaten S1, S2 und S4 nachgewiesen, deshalb sind diese dem Chemotyp S zuzuordnen. In der Probe von Stamm S3 konnten sowohl keine Satratoxine, als auch keine anderen makrocyclischen Trichothecene nachgewiesen werden. Die Atranone A oder C sowie B wurden mit beiden entwickelten Messmethoden mittels Flugzeitmassenspektrometrie in der Probe von Stamm S3 nachgewiesen (Tabelle 40, Seite 81). Dadurch ist dieser Stamm dem Chemotyp A zuzuordnen. Anhand dieser Mykotoxine ist eine direkte chemotaxonomische Differenzierung möglich. Grenzen hat die Bestimmung und Identifizierung von Mykotoxinen in komplexen Matrices durch isomere oder isobare Interferenzen. Substanzen ähnlicher Struktur können direkt mit Hilfe der Massenspektrometrie nur bei einer chromatographischen Trennung unterschieden werden. Dies zeigt sich bei Satratoxin G und H sowie ihren Isomeren (Kapitel 4.3.3). Analyten gleicher Summenformel aber unterschiedlicher Struktur lassen sich jedoch durch ihr Produktionenspektrum differenzieren. Mit den beiden hochauflösenden Massenspektrometern konnten in den Stämmen S1 und S3 nicht immer die gleichen Substanzen nachgewiesen werden. Bei Verrucarin B konnte beispielsweise die Summenformel  $C_{27}H_{32}O_9$  mit der Cap-LC-TOF-MS bestätigt werden, allerdings wurden in allen untersuchten Proben zwei Peaks erhalten. Mit der HPLC-QTOF-MS Methode konnte diese Summenformel nicht bestätigt werden. Ob in den analysierten Proben eine oder zwei Substanzen dieser Summenformel enthalten sind, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden.

#### **5.3.4 Schlussfolgerungen zum qualitativen Nachweis von Mykotoxinen beim Fehlen von Referenzsubstanzen am Beispiel von *Stachybotrys chartarum***

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie durch Kopplung mit der Massenspektrometrie Mykotoxine auch ohne Referenzsubstanzen im spurenanalytischen Bereich nachgewiesen werden können. Eine Unterscheidung von isomeren Substanzen, wie im Beispiel für Satratoxin G und H gezeigt, setzt eine vollständige chromatographische Trennung der Substanzen voraus. Nur dann ist ein Nachweis durch die verschiedenen Retentionszeiten möglich. Grenzen ergeben sich auch bei isobaren Substanzen, die bei einer Co-elution selbst mit der hochauflösenden Flugzeitmassenspektrometrie nicht unterschieden werden können

(van der Heeft et al. 2009). Dem gegenüber bietet die MS/MS Funktionalität bestimmter MS Gerätetypen den Vorteil, das bei einer chromatographischen Trennung der Komponenten diese aber durch ihr Produktionenspektrum, welches Rückschlüsse auf die chemische Struktur ermöglicht, unterschieden werden können (van der Heeft et al. 2009).

Auch wenn einzelne Substanzen einer Spezies zugeordnet werden können, so ist weiterer Forschungsbedarf notwendig, da sich die Mykotoxinprofile zur chemotaxonomischen Bestimmung durch biotische und abiotische Faktoren deutlich unterscheiden können (Jarvis et al. 1995). Durch die Kombination von Flüssigkeitschromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie ist eine chemotaxonomische Differenzierung möglich (Nielsen und Smedsgaard 2003). Mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse können die komplexen, aber auch umfassenden Datensätze, die mit einem TOF generiert werden, auf mögliche gleiche Inhaltsstoffe untersucht werden. Zur Analyse von pflanzlichen Metaboliten haben Grata et al. (2008) ein LC-TOF-MS Methode entwickelt und statistisch ausgewertet. Auch sind so retrospektive Auswertungen alter Datensätze möglich, wenn z.B. eine neue Substanz identifiziert wurde, könnte nach dieser ohne eine neue Messung der Probe in den Messdaten gesucht werden (van der Heeft et al. 2009). Dies würde helfen die komplexen Zusammenhänge der Biosynthesewege aufzuklären.



#### **5.4 Produktionsverlauf der Toxine von *Stachybotrys chartarum***

Durch gezielte Auswahl von geeigneten Stämmen und Inkubationsbedingungen sollten die Möglichkeiten zur optimalen Produktion von Trichothecenen, hier insbesondere von Satratoxin G und H, durch *Stachybotrys chartarum* evaluiert werden (Kapitel 4.4).

##### **5.4.1 Satratoxin G**

Ab der dritten Woche der Inkubation kam es bei allen *Stachybotrys chartarum* Stämmen zu einer verstärkten Bildung von Satratoxin G. Die Stämme S1 und S4 bildeten unter allen Kulturbedingungen deutlich niedrigere Gehalte als die Stämme S1114, S1495 und S1624. Beim Vergleich der Nährmedien konnten mit Instantreisflocken (IRF) meist höhere Gehalte als mit Kartoffelpüree (KP) erreicht werden. Eine verstärkte Toxinproduktion durch eine Senkung der Temperatur ab der dritten Woche von Raumtemperatur auf 4 °C, wie sie in der Literatur beschrieben wird, wurde nur bei Stamm S1495, gewachsen auf KP-Medium, beobachtet. Bei den Stämmen S1624, S1495 und S1114 wurden die maximalen Gehalte von Satratoxin G meist nicht in den am längsten inkubierten Proben gefunden. Dies könnte auf einen Abbau, weitere Metabolisierung oder eine heterogene Bildung der Toxine in den einzelnen Zellkulturflaschen hinweisen. Diese Abnahme der Gehalte beschreiben auch Islam et al. (2009), die einen Abbau von Satratoxin G nach sieben Wochen Inkubation beobachteten. Unter den untersuchten Bedingungen für eine optimale Satratoxin G Ausbeute wurden die größten Mengen mit den Stämmen S1495 und S1624, gewachsen bei Raumtemperatur auf Instantreisflocken, produziert (Tabelle 41, Seite 85).

### **5.4.2 *Satratoxin H***

Eine Zunahme der Gehalte von Satratoxin H wurde in den Proben ab der dritten Woche der Inkubation beobachtet. Die Werte für die Stämme S1114, S1495 und S1624 stiegen von der zweiten auf die dritte Woche sprunghaft an, während die Werte für die Stämme S1 und S4 wesentlich langsamer zunahmen. Mit einem Gehalt von 164 ng/g konnte für den Stamm S1624, kultiviert bei Raumtemperatur auf Instantreisflocken, die mit Abstand höchste Ausbeute von Satratoxin H erreicht werden. Alle anderen Stämme und Kultivierungsbedingungen erzielten deutlich geringere Ausbeuten (Tabelle 42, Seite 87).

### **5.4.3 *Trichoverrin A und B***

Beide Vorläuferprodukte Trichoverrin A und B aus der Biosynthese der Trichothecene (Nielsen 2002) wurden in größeren Konzentrationen in den Extrakten bestimmt. Analog zu den Ergebnissen bei Satratoxin G und H wurden auf dem Instantreismedium höhere Gehalte als auf dem Kartoffelpüree-medium erhalten (Tabelle 43, Seite 88). Mit 4.780 ng/g wurde die höchste Trichoverrin A und B Ausbeute mit dem Stamm S1624, kultiviert bei Raumtemperatur auf Instantreismedium, erzielt. Für die Probe, die ab der dritten Woche bei 4°C inkubiert wurde, wurde mit 3.258 ng/g eine um 32 % niedrigere Konzentration bestimmt. Die Stämme S1, S2 und S1114 erzielten nur 5 – 41 % der Gehalte von Stamm S1624 unter den gleichen Bedingungen. Beim Stamm S1495 entsprachen die ermittelten Gehalte an Trichoverrin A und B mit 36 % - 92 % den von Stamm S1624.

#### **5.4.4 Schlussfolgerungen zum Produktionsverlauf der Toxine von *Stachybotrys chartarum***

Die Wildisolate S1, S4 und S1114 zeigten verglichen mit S1495 und S1624 unter allen Inkubationsbedingungen deutlich niedrigere Gehalte der untersuchten Trichothecene. Der Stamm S1624 produzierte die größte Menge an Satratoxin H, Trichoverrin A und B. Lediglich bei Satratoxin G konnte der Stamm S1495 geringfügig mehr produzieren. Die von Jarvis et al. (1986) beschriebene Senkung der Inkubationstemperatur ab der dritten Woche führte nicht zu einer verstärkten Toxinbildung. Insgesamt wurde mit Instantreisflocken im Vergleich zum Kartoffelpüree als Nährmedium meist mehr Toxin gebildet. S4 bildete nur bei Raumtemperatur auch mehr Satratoxin G bei Verwendung der Instantreisflocken. Dieser Effekt scheint biologisch bedingt und ist nicht auf Matrixeffekte bei der Analyse durch die Nährmedien zurückzuführen, wie die vergleichbaren Wiederfindungsraten belegen. Ob es sich bei den teilweise sinkenden Gehalten mit zunehmender Inkubationsdauer von Stamm S1495 um einen Toxinabbau oder um mikrobiologische Schwankungen handelte, konnte abschließend nicht geklärt werden. Islam et al. (2009) beschreiben eine ähnliche Kinetik in Bezug auf die Bildung von Satratoxin G und Roridin L-2. Da die Inkubation in einzelnen Zellkulturflaschen durchgeführt wurde, ist trotz einer einheitlichen Zugabe von Medium und Vorkultur von individuellem Verhalten auszugehen.

Die maximalen Gehalte an Satratoxin G lagen bei 297 ng/g, bei Satratoxin H bei 164 ng/g und bei Trichoverrin A und B bei 4780 ng/g. Werden diese Werte der halbquantitativen Auswertung mit Angaben aus der Literatur verglichen, so werden für die Stämme S1114 und S1495 durchweg höhere Gehalte angegeben (Höhne 2008, Gareis und Höhne 2009). S1114 produzierte 8,55 µg/g Satratoxin G und 6,95 µg/g Satratoxin H. Der Stamm S1495 konnte 7,69 µg/g Satratoxin G und 8,17 µg/g Satratoxin H erzeugen. Die Trichoverrine wurden in diesen Arbeiten im Gegensatz zu den Satratoxinen nicht mittels HPLC quantifiziert. Abweichend von den Ergebnissen meiner Arbeit wurden mehr als 20-fach höhere Gehalte der beiden Satratoxine in Proben der gleichen Stämme bestimmt. Eine Ursache liegt in der halbquantitativen Auswertung durch Vergleich mit dem strukturverwandten Roridin A. Es kann davon ausgegangen werden, dass Satratoxin G und H trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeiten zu Roridin A andere Ionisierungs- bzw. Fragmentierungsbedingungen für eine ver-

gleichbare Quantifizierung benötigen. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigten Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen untereinander und auch bei den Inkubationsbedingungen auf. Leider stand weder eine Referenzsubstanz noch ein fester Umrechnungsfaktor zur Quantifizierung zur Verfügung. In wie weit sich auch Unterschiede durch die Probenvorbereitung ergeben haben, konnte aus den Literaturquellen nicht eindeutig entnommen werden. Dort ist nicht beschrieben, ob das Mycel getrennt oder mit dem Nährmedium extrahiert worden ist. Wie gezeigt werden konnte, führt eine Anreicherung und Matrixabtrennung durch Festphasenextraktion zu höheren Gehalten der betrachteten Mykotoxine. Für die grundlegenden Experimente dieser Arbeit wurde ein einfaches und kostengünstiges Verfahren angewendet, deshalb wurde das beschriebene Verfahren zur Festphasenanreicherung nur exemplarisch eingesetzt. Ein signifikanter Unterschied, bezogen auf die beiden eingesetzten Nährmedien, konnte bei den Wiederfindungsraten für Roridin A nicht beobachtet werden. Verglichen mit dem von Delmulle et al. (2008) für die Extraktion von Roridin A aus Malzextraktagar beschriebenen Wert von 67,6 %, konnten mit 77,5 % bei KP und 78,3 % bei IRF Nährmedium vergleichbare Wiederfindungsraten bestimmt werden.

Jarvis et al. (1998) beschrieben Stämme von *Stachybotrys chartarum*, die Satratoxine im dreistelligen µg/g-Bereich produzieren können. Die höchsten Werte erreichte hierbei das Isolat „Zsarolyan“ mit 160 µg/g für Satratoxin G und 192 µg/g für Satratoxin H. Für Satratoxin G und Roridin L-2 sind Gehalte von 84 µg/g auf Reismedium in der Literatur beschrieben, somit konnten nach einer Aufreinigung 12 mg Satratoxin G und 4 mg Roridin L-2 erhalten werden (Islam et al. 2009). Auch unter Berücksichtigung von Abweichungen bei der Bestimmung der Gehalte in dieser Arbeit, wie auch bei den zitierten Publikationen untereinander, zeigt sich doch eine sehr große Variabilität in der Produktivität verschiedener Isolate. Des Weiteren stellt sich die Frage, in wie weit die Expression der Gene, die für die Mykotoxinproduktion verantwortlich sind, durch die Überimpfung gestört bzw. gemindert wurde.

Das Ziel der Kultivierung von *Stachybotrys chartarum* Stämmen war die Optimierung der Produktion und Aufreinigung einer genügenden Menge an Satratoxin G und H. Die Summenformeln der Substanzen ließ sich im unteren ng/mL Bereich mit Hilfe der beschriebenen LC-MS Methoden bestimmen. Darüber hinaus ließen sich anhand der Produktionenspektren auch Strukturinformationen zu den Analyten erhalten, die eine chemische Charakterisierung ermöglichten. Für eine eindeutige Bestimmung der che-

mischen Struktur mittels der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) werden allerdings wegen der geringen Empfindlichkeit deutlich höhere Konzentrationen benötigt (Wolfender et al. 2001). Um beispielsweise eine Menge von etwa 1 mg Reinstoff zu erhalten, müsste die Menge von 3,4 kg des Stamms S1624 bei Raumtemperatur auf Instantreisflocken inkubiert und extrahiert werden. Für Satratoxin H wären bei gleichen Bedingungen 6,1 kg Substrat nötig. Im Gegensatz dazu würden für Trichoverrin A und B 209,2 g genügen. Beim Vergleich mit den Literaturwerten für die Toxinproduktion durch die Stämme S1114 und S1495 ergibt sich, dass schon weniger als 150 g Substrat ausreichen würden. Die gleiche Produktivität der Stämme von Jarvis et al. (1986) vorausgesetzt, ergäbe sich die Menge von 1 mg Satratoxin bei nur 6,5 g Substrat. Wegen der bereits diskutierten Schwächen der halbquantitativen Gehaltsbestimmung sind diese Werte nicht absolut. Eine Korrektur bzw. Quantifizierung der Gehalte in den hergestellten Extrakten wäre für zukünftige Arbeiten von Vorteil. Zur genauen Bewertung der erzielten Ergebnisse wäre primär eine genaue Quantifizierung notwendig. Des Weiteren könnte durch eine Suche nach potenteren Wildstämmen die mögliche Ausbeute der makrozyklischen Trichothecene ebenfalls gesteigert werden. Durch Einsatz der Gentechnik könnte auch eine Steigerung der Produktion bewirkt werden. Die Arbeiten von Peltola et al. (2002) und Gareis und Höhne (2009) stellen einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Tri5-Gens und der Bildung von Satratoxin G und H her. Die Steigerung der Expression dieses Gens hätte eine höhere Mykotoxinmenge zur Folge. Eine Aufreinigung der Extrakte und Isolierung von Reinstoffen könnte mittels präoperativer HPLC oder mit dem von Beyer et al. (2009) für die Aufreinigung der Trichothecene T2-Toxin und HT2 eingesetzten Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC) durchgeführt werden.

## 6 Zusammenfassung

Etwa 10 % der Haushalte in Deutschland haben einen direkt sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum. Schimmelpilze können toxische Substanzen (Mykotoxine) produzieren. Diese schwerflüchtigen Verbindungen können sich zusammen mit Partikeln und Sporen im Hausstaub anreichern. Mehr als 400 Schimmelpilzgifte (Mykotoxine) sind heute bekannt, aber nur wenige sind als Referenzsubstanzen käuflich zu erwerben. Bisher wurden Mykotoxine im Innenraum nur an artifiziellen oder fallinduzierten Proben untersucht. Über das Vorkommen von Mykotoxinen in Haushalten ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall ist bisher nur wenig bekannt.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel meiner Arbeit die Entwicklung von sensitiven und selektiven Nachweisverfahren zur Quantifizierung und Identifizierung von ausgewählten Mykotoxinen in Materialien des Innenraums wie Hausstaub auf Basis flüssigkeitschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion. Die Methoden sollten zur Ermittlung von Hintergrundwerten an einer statistisch relevanten Anzahl von Proben angewandt werden.

In dieser Studie wurden 500 Hausstaubproben aus dem bevölkerungsrepräsentativen Kollektiv der Kontrollgruppe der Norddeutschen Leukämie- und Lymphomstudie (NLL) untersucht. Zusätzlich wurden 354 Hausstaubproben zusammen mit einem Fragebogen aus verschiedenen Regionen Deutschlands selbst gesammelt. Diese ließen sich in 153 Proben mit (Schadensfallproben) und 201 ohne (Kontrollproben) sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum unterteilen. Für die Untersuchungen wurde Hausstaub unbekanntes Alters eingesetzt, auf  $\leq 63 \mu\text{m}$  Partikelgröße gesiebt und extrahiert. Die zur Analyse vorgesehenen Mykotoxine wurden anhand einer Literaturrecherche über ihr Vorkommen in Innenräumen, der toxikologischen Relevanz und der Verfügbarkeit von Referenzstandards ausgewählt. Aflatoxin B<sub>1</sub>, Citrinin, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, Gliotoxin, Ochratoxin A, Roridin A und Sterigmatocystin wurden ausgewählt, um mittels Flüssigkeitschromatographie-tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) in den extrahierten Hausstaubproben quantifiziert zu werden. Die entwickelte Methode ist empfindlich, selektiv und zuverlässig für die ausgewählten Zielverbindungen. Die Nachweisgrenzen betragen zwischen 1,1 und 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Hausstaub  $\leq 63 \mu\text{m}$ . Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 40 % für Deoxynivalenol und 89 % für Sterigmatocystin. In 31 von 854 analysierten Hausstaub-

proben konnten die Mykotoxine Citrinin, Deoxynivalenol, Ochratoxin A und Sterigmatocystin quantifiziert werden. Die Konzentrationen lagen im unteren µg pro kg Hausstaub Bereich. Die maximale Konzentration für das am häufigsten detektierte Mykotoxin Sterigmatocystin betrug 2.070 µg/kg Hausstaub. Es gab keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen einem Schimmelpilzbefall im Wohnraum und den nachgewiesenen Mykotoxinen.

Aufgrund der Tatsache, dass Satratoxin G und H als Referenzsubstanzen nicht zur Verfügung stehen, wurden verschiedene Stämme von *Stachybotrys chartarum* kultiviert und extrahiert. Die Extrakte wurden für die qualitative Untersuchung der produzierten Mykotoxine mit unterschiedlichen Messmethoden durch Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und einem Hybridmassenspektrometer, einem Flugzeitmassenspektrometer und einem Quadrupolflugzeitmassenspektrometer analysiert.

Die Mykotoxine Satratoxin G, H und ihre Isomere des Schimmelpilzes *Stachybotrys chartarum* konnten auch ohne Bezug auf Referenzsubstanzen mit den verschiedenen LC-MS-Messverfahren eindeutig nachgewiesen werden. Mit dem Hybridmassenspektrometer konnten die Mykotoxine anhand ihrer Vorläuferionen und dem spezifischen Fragmentierungsmuster charakterisiert werden. Die Summenformeln der Analyten wurden durch Kapillar-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer (Cap-HPLC-TOF-MS) bestätigt. Mit einer sehr guten Massengenauigkeit konnten die Vorläuferionen und das Fragmentierungsmuster durch Messungen mit einem Quadrupolflugzeitmassenspektrometer (HPLC-QTOF-MS) bestätigt werden. Die Messmethoden mit informationsabhängigen MS-Experimenten maximierten die Informationen in einem Chromatographielauf. Die Kombination von Charakterisierung der chemischen Struktur anhand des Fragmentierungsmusters und hochauflösender MS bot die Möglichkeit einer Überprüfung der ausgewählten Verbindungen in einem spurenanalytischen Bereich von ppm bis ppb in einer komplexen Matrix.

Die entwickelten Messmethoden konnten zur Untersuchungen der Toxinprofile bei der Biosynthese von Mykotoxinen an unterschiedlichen Stämmen von *Stachybotrys chartarum* verwendet werden. Anhand des Toxinprofils war es möglich auch ohne molekularbiologische Methoden zwei morphologisch identische Chemotypen von *Stachybotrys chartarum* zu unterscheiden. Nur der Chemotyp S ist in der Lage die hoch zytotoxischen Mykotoxine aus der Gruppe der makrocyclischen Trichothecene zu produzieren. Chemotyp A produziert die weniger giftigen Atranone.

Fünf Wildstammisolate des Chemotyps S wurden unter verschiedenen Bedingungen inkubiert, um die Bildung von Satratoxin G und H zu analysieren. Der maximale Gehalt von Satratoxin G wurde mit 297 ng/g Myzel und für Satratoxin H mit 164 ng/g Myzel bei Stamm S1624 inokuliert bei Raumtemperatur auf Instantreisflocken bestimmt. Im Vergleich zur Literatur sind die maximalen Gehalte der analysierten Trichothecene in den untersuchten Proben sehr niedrig. Mögliche Gründe dafür sind die semi-quantitative Bestimmung durch Kalibration mit dem strukturverwandten Roridin A oder die untersuchten Stämme und Inkubationsbedingungen.

Mit den entwickelten flüssigkeitschromatographischen Trennverfahren und massenspektrometrischen Detektionsmethoden konnten Mykotoxine sensitiv und selektiv in Materialien des Innenraums nachgewiesen werden. Mit den Analysemethoden war auch ohne Referenzsubstanzen im spurenanalytischen Konzentrationsbereich eine Charakterisierung und Identifizierung von Mykotoxinen möglich. Die Untersuchung der Hausstaubproben auf ausgewählte Mykotoxine zeigt trotz weniger positiver Befunde, dass diese in gesundheitlich relevanten Konzentrationen vorhanden sind.



## 7 Summary

Approximately 10 % of households in Germany have direct visible moulds. Moulds can produce toxic metabolites. Particles, spores as well as semi and low volatile compounds like mycotoxins accumulate in house dust. More than 400 mycotoxins are known today, but only a few reference substances are purchasable. In indoor environments mycotoxins have been studied only on artificial or case induced samples until now. The occurrence of mycotoxins in households without visible mould is mostly unknown.

Because of this, the aim of my work was the development of sensitive and selective trace level monitoring methods for quantification and identification of mycotoxins in interior materials like house dust based on liquid chromatographic separation and mass spectrometric detection. The methods should be applied to assess background values at a statistically significant number of samples.

In this study, 500 house dust samples from the control group of a representative collection for the German population were examined. In addition 354 house dust samples were collected together with a questioner in different regions of Germany. 153 of these samples were with (cases) and 201 without (controls) visible indoor moulds. For the investigations house dust of unknown age was collected, sieved to  $\leq 63 \mu\text{m}$  particle size and extracted. The mycotoxins under consideration were selected by a literature search regarding their occurrence in the indoor environment, toxicological aspects and the availability of standards. Thus, aflatoxin B1, citrinin, deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, gliotoxin, ochratoxin A, roridin A and sterigmatocystin were chosen for method development and quantified with multiple-reaction-monitoring in the tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). The developed method is sensitive, selective and reliable for the selected target compounds. The limits of detection were in range of 1.1 and 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  house dust. Recovery rates were between 40 % for deoxynivalenol and 89 % for sterigmatocystin. In 31 of 854 house dust samples citrinin, deoxynivalenol, ochratoxin A and sterigmatocystin could be quantified. Concentration levels were in the lower  $\mu\text{g}/\text{kg}$  house dust range. The maximum concentration for the most prevalent mycotoxin Sterigmatocystin was 2.070  $\mu\text{g}/\text{kg}$  house dust. There was no distinct correlation of a mould infestation in the household and the occurrence of mycotoxins.

Due to the fact that no reference standards are purchasable for mycotoxins from the mould *Stachybotrys chartarum*, different strains were inoculated and extracted. The extracts were used for the qualitative investigation of the produced mycotoxins using different liquid chromatography systems coupled to a hybrid mass spectrometer, a time of flight mass spectrometer and a quadrupole time of flight mass spectrometer. The mycotoxins satratoxin G, H and their isomers from the mould *Stachybotrys chartarum* could be identified without reference substances by using different LC-MS approaches. With the hybrid mass spectrometer it was possible to characterise the substances by their precursor ion and fragmentation pattern. The sum formulas of the analytes were confirmed by capillary liquid chromatography coupled to a time of flight mass spectrometer (Cap-HPLC-TOF-MS). The verification of the precursor ion and the fragmentation pattern was also done with a quadrupole time of flight mass spectrometer (HPLC-Q-TOF-MS) with excellent mass accuracy. With information dependent acquisition methods it was possible to maximize the information in a single LC run. The combination of chemical structure characterization by fragmentation pattern and high resolution MS offers the opportunities for verification of selected compounds in a range of ppm or ppb in a complex matrix.

The developed methods were used for studying the biosynthesis profile of mycotoxin formation from different strain of *Stachybotrys chartarum*. By creating a specific toxin profile, it was possible to distinguish the two morphologically identical chemotypes of *Stachybotrys chartarum* without molecular biological methods. Only the chemotype S is able to produce the highly toxic macrocyclic trichothecenes. Chemotype A can form the less toxic atranones.

Five strains of chemotype S were inoculated under different condition to study the formation of satratoxin G and H. The maximal concentration of satratoxin G was 297 ng/g and for satratoxin H 164 ng/g. This was performed by strain S1624 inoculated at room temperature on instant rice media. Comparison with literature shows that the concentrations of the selected trichothecenes in the samples were rather low. Possible reasons were the semi quantitative determination by calibration with roridin A or the investigated strains and incubation conditions.

The developed liquid chromatographic separation and mass spectrometric detection methods are sensitive and selective to detect mycotoxins in interior materials. Additionally the developed methods could be used for characterization and identification of mycotoxins in trace analysis concentrations with no need of reference compounds.

The determination of the selected mycotoxins in house dust shows in spite of less-positive findings that these substances can be found in health-relevant concentrations.

## 8 Literaturverzeichnis

- Andersen, B., B. B. Jarvis und K. F. Nielsen (2002): Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 94: 392-403.
- Annesley, T. M. (2003): Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 49: 1041-1044.
- Baudisch, C., O. Assadian und A. Kramer (2009a): Concentration of the genera *Aspergillus*, *Eurotium* and *Penicillium* in 63- $\mu$ m house dust fraction as a method to predict hidden moisture damage in homes. *BMC Public Health* 9: 247 (p. 1-9).
- Baudisch, C., O. Assadian und A. Kramer (2009b): Evaluation of errors and limits of the 63- $\mu$ m house-dust fraction method, a surrogate to predict hidden moisture damage. *BMC Res Notes* 2: 218 (p. 1-6).
- Bennett, J. W. und M. Klich (2003): Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16: 497-516.
- Berger-Preiss, E., A. Preiss, K. Sielaff, M. Raabe, B. Ilgen und K. Levsen. (1997): The behaviour of pyrethroids indoors: A model study. *Indoor Air* 7: 248-261.
- Beyer, M., I. Ferse und H. U. Humpf (2009): Large-scale production of selected type A Trichothecenes: the use of HT-2 toxin and T-2 triol as precursors for the synthesis of d 3-T-2 and d 3-HT-2 toxin. *Mycotox Res* 25: 41-52.
- Bhat, R., R. V. Ral und A. A. Karim (2010): Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 9: 57-81.
- Bloem, R. J., T. A. Smitka, R. H. Bunge und J. C. French (1983): Roridin L-2, a new Trichothecene. *Tetrahedron Lett* 24: 249-252.
- Bloom, E. (2008): Mycotoxins in Indoor Environments. Department of Laboratory Medicine, Division of Medical Microbiology, Lund University, Sweden, Dissertation.
- Bloom, E., K. Bal, E. Nyman und L. Larsson (2007): Optimizing a GC-MS method for screening of *Stachybotrys* mycotoxins in indoor environments. *J Environ Monitor* 9: 151-156.
- Bloom, E., L. F. Grimsley, C. Pehrson, J. Lewis und L. Larsson (2009): Molds and mycotoxins in dust from water-damaged homes in New Orleans after hurricane Katrina. *Indoor Air* 19: 153-158.
- Bonfiglio, R., R. C. King, T. V. Olah und K. Merkle (1999): The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13: 1175- 1185.
- Brasche, S. und W. Bischof (2005): Daily time spent indoors in German homes-baseline data for the assessment of indoor exposure of German occupants. *Int J Hyg Environ Health* 208: 247-253.
- Brasche, S., E. Heinz, T. Hartmann, W. Richter und W. Bischof (2003): Vorkommen, Ursachen und gesundheitliche Aspekte von Feuchteschäden in Wohnungen. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 46: 683-693.
- Bünger, J., G. Westphal, A. Monnich, B. Hinnendahl, E. Hallier und M. Müller (2004): Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicol* 202: 199-211.
- Butte, W. (1999): Occurrence of biocides in the indoor environment. p. 233-303 in: *Organic Indoor Air Pollution*. T. Salthammer (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim.
- Butte, W. (2004): Bewertung von Bioziden, PAH und Phthalaten im Hausstaub. S. 285-303 in: *Staub und Staubinhaltsstoffe*. KRdL-Schriftenreihe Band 33, Düsseldorf.
- Butte, W. und B. Heinzow (2002): Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. *Rev Environ Contam Toxicol* 175:1-46.

- Butte, W., W. Hoffmann, O. Hostrup, A. Schmidt und G. Walker (2001): Endokrin wirksame Substanzen in Hausstaub. *Gefahrst Reinhalt Luft* 61: 19-23.
- Butte, W. und G. Walker (1994): Sinn und Unsinn von Hausstaubuntersuchungen - das für und wider. *VDI-Berichte* 1122: 535-546.
- Cabaret, O., O. Puel, F. Botterel und M. Pean (2010): Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Chem Res Toxicol* 23: 1673–1681.
- Cech, N. B. und C. G. Enke (2001): Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev* 20: 362-387.
- Clausnitzer, K. D. (2006a): Schimmelpilze im Mietwohnungsbestand. *Bauphysik* 28: 388-391.
- Clausnitzer, K. D. (2006b): Vermeiden Gasetagenheizungen Schimmelpilze? Bremer Energie Institut, Bremen. <http://www.energiwelt.de/web/cms/mediablob/de/323580/data/323566/3/informieren/infocenter/downloads/Februar-2006-Schimmelpilze-in-Wohnungen-.pdf>
- Cole, R. B. (2010): Electrospray and MALDI Mass Spectrometry. Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications. 2<sup>nd</sup> ed., J. Wiley & Sons, Hoboken.
- Cole, R. J., B. B. Jarvis und M. A. Schweikert (2003): Handbook of Secondary Fungal Metabolites - Volume III. Academic Press, San Diego.
- Cole, R. J. und M. A. Schweikert (2003a): Handbook of Secondary Fungal Metabolites - Volume I. Academic Press, San Diego.
- Cole, R. J. und M. A. Schweikert (2003b): Handbook of Secondary Fungal Metabolites - Volume II. Academic Press, San Diego.
- Dass, C. (2007): Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. J. Wiley & Sons, Hoboken.
- De Hoffmann, E. und V. Stroobant (2007): Mass Spectrometry. Principles and Applications. 3<sup>rd</sup> ed. J. Wiley & Sons, Chichester.
- Delmule, B., S. de Saeger, A. Adams, N. de Kimpe und C. van Peteghem (2006): Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 771-776.
- DIN (1986): 38402 - Teil 51 Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen. Beuth, Berlin.
- DIN (1987a): 38409 – Teil 1 Bestimmung des Gesamttrockenrückstandes, des Filtrattrockenrückstandes und des Glührückstandes. Beuth, Berlin.
- DIN (1987b): 66165 - Teil 2 Siebanalyse, Durchführung. Beuth, Berlin.
- DIN (2008): 32645 Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth, Berlin.
- Engelhart, S., A. Loock, D. Skutlarek, H. Sagunski, A. Lommel, H. Farber und M. Exner (2002): Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Environ Microbiol* 68: 3886-3890.
- Eppley, R. M., E. P. Mazzola, R. J. Highet und W. J. Bailey (1977): Structure of Satratoxin H, a metabolite of *Stachybotrys atra* - Application of proton and C-13 nuclear magnetic resonance. *J Org Chem* 42: 240-243.
- Eppley, R. M., E. P. Mazzola, M. E. Stack und P. A. Dreifuss (1980): Structures of Satratoxin F and Satratoxin G, proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Org Chem* 45: 2522-2523.

- Ertl, H. (2006): In vitro-Resorptionsverfügbarkeit von Bioziden und PCB aus Hausstaub bei Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt bzw. durch die Haut. Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften. Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg, Dissertation.
- Ertl, H., C. Portner, V. Plegge, T. Teutenberg, J. Türk und W. Butte (2007): Quantifizierung von 7 Mykotoxinen in Hausstaub mittels HPLC-MS/MS und MS<sup>n</sup>-Screening nach Schimmelpilzmarkern sowie weiteren Toxinen. Poster, ANAKON 2007, Jena.
- EU-Commission (1996): Opinions of the Scientific Committee for Food Reports of the Scientific Committee for Food. Series 35, Brüssel.  
[http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scf\\_reports\\_35.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scf_reports_35.pdf)
- EU-Commission (1998): Opinion of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A. (expressed on 17 September 1998).  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out14\\_en.html](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out14_en.html)
- EU-Commission (1999): Opinion on Fusarium toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON). Brüssel.  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf)
- EU-Commission (2002): Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. Brüssel.  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf)
- EU-Kommission (2002): Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft L221/8.  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:DE:PDF>
- EU-Kommission (2006a): Verordnung (EG) Nr. 401/2006 der Kommission zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln. Amtsblatt der Europäischen Union L70/12.  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:DE:PDF>
- EU-Kommission (2006b): Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln, Amtsblatt der Europäischen Union L364/5. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:DE:PDF>
- Feldmann, T., B. Oertel, U. Steiner und G. Noga (2003): Untersuchungen zum Vorkommen von Mykotoxinen bei Auftreten der Rußfleckenkrankheit an Apfelfrüchten. Forschungsbericht 110, Landwirtschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn. <http://www.usl.uni-bonn.de/pdf/Forschungsbericht%20110.pdf>
- Friedrich, C., D. Helm, K. Becker, K. Hoffmann, C. Krause, P. Nöllke, M. Seiwert und B. Seifert (2001): Umwelt-Survey 1990/92, Band VI: Hausstaub - Deskription der Spurenelement- und Biozidgehalte im Hausstaub in der Bundesrepublik Deutschland. *WaBoLu Heft* 01/01.
- Frössel, F. (2006): Schimmelpilze in Wohnungen. Baulino Verlag, Werder.
- Gabrio, T., B. Dill, C. Trautman und U. Weidner (2005a): Schimmelpilze in Luft - Probenahme und Bestimmung. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 48: 3-11.
- Gabrio, T., I. Dill, C. Trautman und U. Weidner (2005b): Schimmelpilze im Hausstaub. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 48: 21-28.
- Gareis, M. (1999): Mykotoxine und Schimmelpilze. *Forsch Rep* 2: 4-5.
- Gareis, M. und M. Höhne (2009): Morphology, cytotoxicity and mycotoxin production of *Stachybotrys* spp.. Poster, 31<sup>st</sup> Mycotoxin-Workshop. Münster.
- Gareis, M., S. Lick und E. Riemenschneider (2009): Exudate droplets produced by toxigenic strains of *Stachybotrys chartarum*. Vortrag, 31<sup>st</sup> Mycotoxin-Workshop. Münster.

- Gosetti, F., E. Mazzucco, D. Zampieri und M. C. Gennaro (2010): Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217: 3929-3937.
- Gottschalk, C., J. Bauer und K. Meyer (2006): Determination of macrocyclic Trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotox Res* 22: 189-192.
- Gottschalk, C., J. Bauer und K. Meyer (2008): Detection of Satratoxin G and H in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathol* 166: 103-107.
- Grant, C., C. A. Hunter, B. Flannigan und A. F. Bravery (1989): The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int Biodeterior* 25: 259-284.
- Grata, E., J. Boccard, D. Guillarme, G. Glauser, P. A. Carrupt, E. E. Farmer, J. L. Wolfender und S. Rudaz (2008): UPLC-TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. *J Chromatogr B* 871: 261-270.
- Gros, M., T. M. Pizzolato, M. Petrovic, M. J. de Alda und D. Barcelo (2008): Trace level determination of beta-blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1189: 374-384.
- Gross, J. H. (2011): Mass Spectrometry - A Textbook. 2<sup>nd</sup> ed. Springer, Heidelberg.
- Guillarme, D., J. Schappler, S. Rudaz und J. L. Veuthey (2010): Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *Trac-Trend Anal Chem* 29: 15-27.
- Hankammer, G. und W. Lorenz (2007): Schimmelpilze und Bakterien in Gebäuden - Erkennen und Beurteilen von Symptomen und Ursachen. Rudolf Müller, Köln.
- Harrach, B., C. J. Mirocha, S. V. Pathre und M. Palyusik (1981): Macrocyclic Trichothecene toxins produced by a strain of *Stachybotrys atra* from Hungary. *Appl Environ Microbiol* 41: 1428-1432.
- Hendry, K. M. und E. C. Cole (1993): A review of mycotoxins in indoor air. *J Toxicol Environ Health* 38: 183-198.
- Herath, H. M. D. R., P. N. Shaw, P. Cabot und A. K. Hewavitharana (2010): Effect of ionization suppression by trace impurities in mobile phase water on the accuracy of quantification by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24: 1502-1506.
- Hernandez, F., M. Ibanez, J. V. Sancho und S. J. Pozo (2004): Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points. *Anal Chem* 76: 4349-4357.
- Hinkley, S. F. und B. B. Jarvis (2001): Chromatographic method for *Stachybotrys* toxins. p. 173-194 in: *Methods in Molecular Biology, Vol. 157, Mycotoxin protocols*. M. W. Trucksess und A. E. Pohland (Eds.), Humana, Totowa.
- Hintikka, E.-L. und R. Holopainen (2009): Mycotoxins in the ventilation systems of four schools in Finland. *World Mycotox J* 2: 369-379.
- Hoffmann, W., C. Terschueren, H. Heimpel, A. Feller, W. Butte, O. Hostrup, D. Richardson und E. Greiser (2008): Population-based research on occupational and environmental factors for leukemia and non-Hodgkin's lymphoma: The Northern Germany Leukemia and Lymphoma Study (NLL). *Am J Ind Med* 51: 246-257.
- Höhne, M. (2008): Untersuchungen zur Mykotoxinbildung durch *Stachybotrys chartarum* Chemotyp S. Fachbereich Biotechnologie, Fachhochschule Jena, Jena, Diplomarbeit.

- Hopfgartner, G., E. Varesio, V. Tschappat, C. Grivet, E. Bourgoigne und L. A. Leuthold (2004): Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J Mass Spectrom* 39: 845-855.
- Hutter, D. H.-P., D. H. Moshhammer, D. P. Wallner, P. Tappler, F. Twrdik, D. E. Ganglberger, M. S. Geissler und I. A. Wenisch (2005): Auswirkungen energiesparender Maßnahmen im Wohnbau auf die Innenraumlufthausqualität und Gesundheit. Endbericht Forschungsvorhaben F 1469. <http://www.ecology.at/files/berichte/E04.317.pdf>
- Islam, Z., J. Shinozuka, J. R. Harkema und J. J. Pestka (2009): Purification and comparative neurotoxicity of the Trichothecenes Satratoxin G and Roridin L2 from *Stachybotrys chartarum*. *J Toxicol Environ Health A* 72: 1242-1251.
- IUPAC (2011): Compendium of Chemical Terminology (Goldbook), Version 2.3, International Union of Pure and Applied Chemistry. <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>
- Jarvis, B. B. und S. F. Hinkley (1999): Analysis for *Stachybotrys* toxins. P. 232-239 in: *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control*. E. Johanning (Ed.). Boyd, New York.
- Jarvis, B. B., Y. W. Lee, S. N. Comezoglu und C. S. Yatawara (1986): Trichothecenes produced by *Stachybotrys atra* from Eastern Europe. *Appl Environ Microbiol* 51: 915-922.
- Jarvis, B. B. und J. D. Miller (2005): Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 367-372.
- Jarvis, B. B., J. Salemme und A. Morais (1995): *Stachybotrys* toxins. 1. *Nat Toxins* 3: 10-16.
- Jarvis, B. B., W. G. Sorenson, E. L. Hintikka, M. Nikulin, Y. Zhou, J. Jiang, S. Wang, S. Hinkley, R. A. Etzel und D. Dearborn (1998): Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Appl Environ Microbiol* 64: 3620-3625.
- Kasel, U., G. Wichmann und M. Bleck (1999): Ochratoxin A im Hausstaub. *Umweltmed Forsch Prax* 4: 301-303.
- Keller, R., Reinhardt-Benitez, S., Döringer, K., Eilers, J., Laußmann, D., Mergner, H.-J., Ohgke, H., Schmidt, A., Senkpiel, K., Solbach, W., Walker, G., Weiß, R., Butte, W. (2004): Hintergrundwerte von flüchtigen Schimmelpilzmetaboliten in unbelasteten Wohngebäuden. *Gefahrst Reinhalt Luft* 44: 187-190.
- King, R., R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein und T. Olah (2000): Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 11: 942-950.
- King, R. und C. Fernandez-Metzler (2006): The use of Qtrap technology in drug metabolism. *Curr Drug Metab* 7: 541-545.
- Klotzel, M., B. Gutsche, U. Lauber und H. U. Humpf (2005): Determination of 12 type A and B Trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53: 8904-8910.
- Kosjek, T., D. Zigon, B. Kralj und E. Heath (2008): The use of quadrupole-time-of-flight mass spectrometer for the elucidation of diclofenac biotransformation products in wastewater. *J Chromatogr A* 1215: 57-63.
- Krauss, M., H. Singer und J. Hollender (2010): LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Anal Bioanal Chem* 397: 943-951.
- Kromidas, S. (2002): Practical Problem Solving in HPLC. Wiley-VCH, Weinheim.



- Krska, R., P. Schubert-Ullrich, A. Molinelli, M. Sulyok, S. MacDonald und C. Crews (2008): Mycotoxin analysis: an update. *Food Addit Contam A* 25: 152-163.
- Kück, U., M. Nowrousian, B. Hoff und I. Engh (2009): Schimmelpilze. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lagana, A., R. Curini, G. D'Ascenzo, I. De Leva, A. Faberi und E. Pastorini (2003): Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification and determination of Trichothecenes in maize. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 1037-1043.
- Li, A. C., M. A. Gohdes und W. Z. Shou (2007): 'N-in-one' strategy for metabolite identification using a liquid chromatography/hybrid triple quadrupole linear ion trap instrument using multiple dependent product ion scans triggered with full mass scan. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21: 1421-1430.
- Mallet, A. I. und S. Down (2009): Dictionary of Mass Spectrometry, J. Wiley & Sons, Chichester.
- Marquet, P. und G. Lachatre (1999): Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B* 733: 93-118.
- Masten, S. A. (2004): *Stachybotrys chartarum* - Review of Toxicological Literature. U. S. Department of Health and Human Services, Contract No. N01-ES-35515. [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem\\_background/exsumpdf/stachybotrys.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/stachybotrys.pdf)
- Matuszewski, B. K., M. L. Constanzer und C. M. Chavez-Eng (1998): Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem* 70: 882-991.
- Matuszewski, B. K., M. L. Constanzer und C. M. Chavez-Eng (2003): Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75: 3019-3030.
- Maurer, H. H. und F. T. Peters (2005): Toward high-throughput drug screening using mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 27: 686-688.
- Mayer, S., S. Engelhart, A. Kolk und H. Blome (2007a): Bedeutung von Mykotoxinen im Rahmen der arbeitsplatzbezogenen Gefährdungsbeurteilung. *Gefahrst Reinhalt Luft* 67: 407-417.
- Mayer, S., S. Engelhart, A. Kolk und H. Blome (2008): The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace-related hazards. *Mycotox Res* 24: 151-164.
- Mayer, S., M. Gareis, G. H. Degen, M. Blaszkewicz, V. Curtui und E. Usleber (2007b): Belastung durch luftgetragene Mykotoxine im Getreidelägern und Mykotoxinkonzentrationen im Blut von Getreidelagerarbeitern. *Gefahrst Reinhalt Luft* 67: 119-125.
- Mekel, O., O. Mosbach-Schulz, M. Schürmann, P.-K. Okken, C. Peters, J. Hermann, O. Hehl, M. Bibenheim, R. Fehr und J. Timm (2007a): Evaluation von Standards und Modellen zur probabilistischen Expositionseinschätzung Teil 2: Empfehlungen für Expositionsfaktoren. *WaBoLu Heft* 03/07.
- Mekel, O. O. Mosbach-Schulz, M. Schürmann, P.-K. Okken, C. Peters, J. Hermann, O. Hehl, M. Bibenheim, R. Fehr und J. Timm (2007b): Evaluation von Standards und Modellen zur probalistischen Expositionsabschätzung X-prob Abschlussbericht, Fakultät Gesundheitswissenschaften, Universität Bielefeld, Bielefeld. [http://www.apug.de/risiken/forschungsprojekte/xprob/Xprob\\_Projekt\\_Abschlussbericht\\_Teil\\_1.pdf](http://www.apug.de/risiken/forschungsprojekte/xprob/Xprob_Projekt_Abschlussbericht_Teil_1.pdf)
- Meyer, V. (1979): Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, 8. Auflage, Salle + Sauerländer, Frankfurt am Main.
- Miller, J. D., T. G. Rand und B. B. Jarvis (2003): *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? *Med Mycol* 41: 271-291.
- Molnar, I. (2002): Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software. *J Chromatog A* 965: 175-194.

- Morawska, L. und T. Salthammer, (Eds.) (2003): Indoor Environment. Wiley-VCH, Weinheim.
- Moriske, H. J. und R. Szewzyk, (Eds.) (2002): Leitfaden zur Vorbeugung, Untersuchung, Bewertung und Sanierung von Schimmelpilzwachstum in Innenräumen. Umweltbundesamt. Berlin.
- Mücke, W. und C. Lemmen (1999): Schimmelpilze. ecomed Medizin, Landsberg.
- Müssig-Zufika, M., K. Becker, A. Conrad, C. Schulz, I. Seiffert, M. Seiwert, C. Lusansky, H. Pick-Fuß und M. Kolossa-Gehring (2008): Kinder-Umwelt-Survey 2003/06 - KUS - Hausstaub- Stoffgehalte im Hausstaub aus Haushalten mit Kindern in Deutschland. *WaBoLu Heft* 02/08.
- Neue, U. D. (2007): Stationary phase characterization and method development. *J Sep Sci* 30: 1611-1627.
- Neue, U. D. und M. Kele (2007): Performance of idealized column structures under high pressure. *J Chromatogr A* 1149: 236-244.
- Neue, U. D. und A. Mendez (2007): Selectivity in reversed-phase separations: general influence of solvent type and mobile phase pH. *J Sep Sci* 30: 949-963.
- Nielsen, K. F. (2002): Mould growth on building materials Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. BioCentrum, Technical University of Denmark, Lyngby, Dissertation.
- Nielsen, K. F. (2003): Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol* 39: 103-117.
- Nielsen, K. F., S. Gravesen, P. A. Nielsen, B. Andersen, U. Thrane und J. C. Frisvad (1999): Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathol* 145: 43-56.
- Nielsen, K. F., K. Huttunen, A. Hyvarinen, B. Andersen, B. B. Jarvis und M. R. Hirvonen (2002): Metabolite profiles of *Stachybotrys* isolates from water-damaged buildings and their induction of inflammatory mediators and cytotoxicity in macrophages. *Mycopathol* 154: 201-205.
- Nielsen, K. F. und J. Smedsgaard (2003): Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A* 1002: 111-136.
- Nielsen, K. F., U. Thrane, T. O. Larsen, P. A. Nielsen und S. Gravesen (1998): Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *Int Biodeterior Biodegr* 42: 9-16.
- Niessen, W. M. A. und A. P. Tinke (1995): Liquid chromatography-mass spectrometry - General principles and instrumentation. *J Chromatogr A* 703: 37-57.
- NIST (2011): Mass spectral library. J. Wiley & Sons, Hoboken.
- Nyiredy, S., Z. Szucs und L. Szepesy (2007): Stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: Basic possibilities of serially connected columns using the PRISMA principle. *J Chromatogr A* 1157: 122-130.
- Nyiredy, S., W. Wosniok, H. Thiele und O. Sticher (1991): Prisma model for computer-aided HPLC mobile phase optimization based on an automatic peak identification approach. *J Liq Chromatogr* 16: 3077-3110.
- Oberacher, H., M. Pavlic, K. Libiseller und B. Schubert (2009a): On the inter-instrument and inter-laboratory transferability of a tandemmass spectral reference library: 1. Results of an Austrian multi-center study. *J Mass Spectrom* 44: 485-493.
- Oberacher, H., M. Pavlic, K. Libiseller und B. Schubert (2009b): On the inter-instrument and the inter-laboratory transferability of a tandem mass spectral reference library: 2. Optimization and characterization of the search algorithm. *J Mass Spectrom* 44: 494-502.

- Oberacher, H., W. Weinmann und S. Dresen (2011): Quality evaluation of tandem mass spectral libraries. *Anal Bioanal Chem* 400: 2641-2648.
- Otto, M. (2006): Analytische Chemie. 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Paustenbach, D. J. (2000): The practice of exposure assessment: A state-of-the-art review. *J Toxicol Environ Health B* 3: 179-291.
- Pavlic, M., K. Libiseller und H. Oberacher (2006): Combined use of ESI-QqTOF-MS and ESI-QqTOF-MS/MS with mass-spectral library search for qualitative analysis of drugs. *Anal Bioanal Chem* 386: 69-82.
- Peltola, J., L. Niessen, K. F. Nielsen, B. B. Jarvis, B. Andersen, M. Salkinoja-Salonen und E. M. Moller (2002): Toxigenic diversity of two different RAPD groups of *Stachybotrys chartarum* isolates analyzed by potential for Trichothecene production and for boar sperm cell motility inhibition. *Can J Microbiol* 48: 1017-1029.
- Petrovic, M., M. Gros und D. Barcelo (2006): Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1124: 68-81.
- Pineda-Valdes, G. und L. B. Bullerman (2000): Thermal stability of moniliformin at varying temperature, pH, and time in an aqueous environment. *J Food Protect* 63: 1598-1601.
- Pitt, J. I., J. C. Basilico, M. L. Abarca und C. Lopez (2000): Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol* 38: 41-46.
- Portner, C., V. Plegge, A. Boergers, I. Toepfer, J. Türk und W. Butte (2009a): Opportunities and drawbacks of LC-MS for investigation of mycotoxins in house dust with and without reference substances. Poster, 18<sup>th</sup> IMSC, Bremen.
- Portner, C., V. Plegge und W. Butte (2007): Indoor moulds – First results for mycotoxins in house dust. Vortrag, 1. Jahrestagung GHUP, Bielefeld.
- Portner, C., V. Plegge, T. Teutenberg, I. Toepfer, J. Türk und W. Butte (2008a): Analysis of mycotoxins in house dust using LC-MS/MS and LC-MS<sup>n</sup>. Poster, 21<sup>st</sup> Analytica, München.
- Portner, C., V. Plegge, T. Teutenberg, J. Türk und W. Butte (2008b): Schimmelpilze in Innenräumen – Erste Ergebnisse für Mykotoxine im Hausstaub. Poster, Fachtagung Biologische Gefährdung, BG Bau, Jöbnitz.
- Portner, C., V. Plegge, I. Toepfer und W. Butte (2009b): Opportunities and drawbacks of LC-MS for investigation of mycotoxins in house dust with and without reference substances. Vortrag, 31<sup>st</sup> Mycotoxin-Workshop, Münster.
- Portner, C., V. Plegge, I. Toepfer und W. Butte (2011): Mycotoxins in house dust – final results of a systematic study. Vortrag, 33<sup>rd</sup> Mycotoxin-Workshop, Freising.
- Portner, C., V. Plegge, I. Toepfer, J. Türk und W. Butte (2009c): Möglichkeiten von LC-MS/MS und LC-MS<sup>n</sup> zur Untersuchung von Mykotoxinen im Hausstaub auch ohne Referenzsubstanzen. Vortrag, ANAKON 2009, Berlin.
- Portner, C., V. Plegge, I. Toepfer, J. Türk und W. Butte (2010): Möglichkeiten und Grenzen der LC-MS zur Bestimmung von Mykotoxinen im Hausstaub auch ohne Referenzsubstanzen. Vortrag, 8. LC/MS-Diskussionstreffen, Wuppertal.
- Raters, M. und R. Matissek (2008): Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Mycotox Res* 24: 130-134.
- Reemtsma, T. (2003): Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *J Chromatogr, A* 1000: 477-501.

- Reiß, J. (1976): Mykotoxine, Giftstoffe von Kleinpilzen. *Biol unserer Zeit* 6: 169-174.
- Richard, J. L., R. D. Plattner, J. May und S. L. Liska (1999): The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathol* 146: 99-103.
- Rolle-Kampczyk, U., A. Müller, U. Diez, M. Rehwagen, A. Schwenke, G. Metzner und O. Herbarth (2001): Hausstaub als Quelle für eine potentielle Belastung mit Mykotoxinen - ein Fallbeispiel. *Umweltmed Forsch Pract* 6: 42-46.
- Sagunski, H., J. Blasius, M. Csicsaky, M. Henseling, A. Kappos, L. Müller, H. Neus, I. Ollroge, E. Roßkamp, J. Scheidereiter, R. Türck, H. Weber, J. Wuthe und B. Kouros (1995): Standards zur Expositionsabschätzung. Bericht des Ausschusses für Umwelthygiene, Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Hamburg. [http://www.apug.de/archiv/pdf/Expositionsabschaetzung\\_Laender\\_1995.pdf](http://www.apug.de/archiv/pdf/Expositionsabschaetzung_Laender_1995.pdf)
- Samson, R. A., E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad und O. Filtenborg (2002): Introduction to food- and air-borne fungi. Ponsen & Looyen, Wageningen.
- Sargeant, K., A. Sheridan und J. Okelly (1961): Toxicity Associated with Certain Samples of Groundnuts. *Nature* 192: 1096-1097.
- Sauvage, F. L., F. Saint-Marcoux, B. Duretz, D. Deporte, G. Lachatre und P. Marquet (2006): Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 52: 1735-1742.
- Schleibinger, H., D. Laussmann, D. Eis, H. Samwer, A. Nickelmann und H. Rüden (2004): Unterscheidung von Schimmel- und Nichtschimmelwohnungen anhand von Sporen aus Hausstaubproben. *Umweltmed Forsch Pract* 9: 363-376.
- Schulz, C., u. Wolf, K. Becker, A. Conrad, A. Hünken, A. Lüdecke, M. Müssig-Zufika, S. Riedel, I. Seifert, M. Seiwert und M. Kolossa-Gehring (2007): Kinder-Umwelt-Survey (KUS) im Rahmen des Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS). *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitschutz* 5: 889-894.
- Schwan, M. (2009): Produktion von sekundären Metaboliten durch *Stachybotrys chartarum* sowie deren Analyse mittels HPLC-MS. Fachbereich Chemie, Hochschule Niederrhein, Krefeld, Diplomarbeit.
- Schwimmer, M. (01.12.2011): Postleitzahlen in Karte darstellen. <http://michael-schwimmer.de/vba097.htm>
- Seifert, B., K. Becker, K. Hoffmann, C. Krause und C. Schulz (2000): The German environmental survey 1990/1992 (GerES II): a representative population study. *J Expo Anal Environ Epid* 10: 103-114.
- Sforza, S., C. Dall'asta und R. Marchelli (2006): Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 25: 54-76.
- Shephard, G. S. und F. Berthiller (2011): Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. *World Mycotox J* 4: 3-28.
- Snyder, L. R. und J. J. Kirkland (1979): Introduction to Modern Liquid Chromatography, J. Wiley & Sons, Chichester.
- Songsermsakul, P. und E. Razzazi-Fazeli (2008): A Review of recent trends in applications of liquid chromatography mass spectrometry for determination of mycotoxins. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 31: 1641-1686.
- Steck, W. und K. Cammann (2006): Harmonisierter Leitfaden für die Validierung von Analysemethoden durch Einzellaboratorien. *Angew Chemie* 118: 2019-2034.

- Sulyok, M., F. Berthiller, R. Krska und R. Schuhmacher (2006): Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 2649-2659.
- Sulyok, M., R. Krska und R. Schuhmacher (2007a): A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem* 389: 1505-1523.
- Sulyok, M., R. Krska und R. Schumacher (2007b): Multianalyt-Methoden mittels ESI Triple- Quadrupol- Massenspektrometrie: Herausforderungen und Limitierungen anhand des Beispiels Mykotoxine. *LC GC* 12: 6-14.
- Täubel, M., M. Sulyok, V. Vishwanath, E. Bloom, M. Turunen, K. Järvi, E. Kauhanen, R. Krska, A. Hyvärinen, L. Larsson und A. Nevalainen (2011): Co-occurrence of toxic bacterial and fungal secondary metabolites in moisture-damaged indoor environments. *Indoor Air* 21: 368-375.
- Teutenberg, T., V. Plegge, C. Portner und M. Duisken (2008): Entwicklung analytischer Trennmethode am Beispiel der Problematik von Mykotoxinen im Innenraum. *LC GC deutsch Spr* 09/10: 6-9.
- Thurman, E. M., I. Ferrer, J. A. Zweigenbaum, J. F. Garcia-Reyes, M. Woodman und A. R. Fernandez-Alba (2005): Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1082: 71-80.
- Toepfer, I. (2010): Nachweismethoden für Schimmelpilze und deren Metaboliten in Innenräumen. Oldenburg, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg, Dissertation.
- Toepfer, I. und W. Butte (2009): Chemische Indikatoren für Schimmelpilze im Hausstaub. *Gefahrst Reinhalt Luft* 69: 91-95.
- Toepfer, I., C. Portner und W. Butte (2010): Schimmelpilze im Hausstaub von Wohnungen mit und ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall. *Gefahrst Reinhalt Luft* 70: 418-422.
- Trautmann, C., T. Gabrio, I. Dill und U. Weidner (2005): Hintergrundkonzentrationen von Schimmelpilzen in Hausstaub. Erhebung von Schimmelpilzkonzentrationen in Wohnungen ohne bekannte Schimmelpilzschäden in 3 Regionen Deutschlands. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitschutz* 48: 29-35.
- Tuomi, T., K. Reijula, T. Johnsson, K. Hemminki, E. L. Hintikka, O. Lindroos, S. Kalso, P. Koukila-Kahkola, H. Mussalo-Rauhamaa und T. Haahtela (2000): Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol* 66: 1899-1904.
- Tuomi, T., L. Saarinen und K. Reijula (1998): Detection of polar and macrocyclic Trichothecene mycotoxins from indoor environments. *Analyst* 123: 1835-1841.
- Türk, J. (2007): Entwicklung und Anwendung von LC-MS/MS Multimethoden zur Bestimmung von Antibiotika und Zytostatika bei Arbeitsschutz- und Umweltuntersuchungen. Fachbereich Chemie, Instrumentelle Analytik, Universität Duisburg-Essen, Duisburg, Dissertation.
- Umweltbundesamt (1997): Stoffmonographie Pentachlorphenol-Referenz- und Human-Biomonitoring-Werte (HBM) *Bundesgesundheitsbl* 40: 212-222.
- van der Heeft, E., Y. J. C. Bolck, B. Beumer, A. Nijrolder, A. A. M. Stolker und M. W. F. Nielen (2009): Full-scan accurate mass selectivity of ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight and Orbitrap mass spectrometry in hormone and veterinary drug residue analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 20: 451-463.
- Van Eeckhaut, A., K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders und Y. Michotte (2009): Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B* 877: 2198-2207.

VDI-RICHTLINIEN (2001): Messen von Innenraumluftverunreinigungen Probenahme von Hausstaub. VDI 4300 - Blatt 8, Verein Deutscher Ingenieure, Beuth, Berlin.

VDI-RICHTLINIEN (2008): Messen von Innenraumluftverunreinigungen - Messstrategien zum Nachweis von Schimmelpilzen im Innenraum. VDI 4300 - Blatt 10, Verein Deutscher Ingenieure, Beuth, Berlin.

Vishwanath, V., M. Sulyok und R. Labuda (2009): Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 395: 1355-1372.

Walker, G., O. Hostrup, W. Hoffmann und W. Butte (1999): Biozide im Hausstaub: Ergebnisse eines repräsentativen Monitorings in Innenräumen. *Gefahrst Reinhalt Luft* 59: 33-41.

Wang, J.-S. und J. D. Groopman (1999): DNA damage by mycotoxins. *Mutation Res* 424: 167-181.

Wang, J., H. F. Pan, Z. Z. Liu und F. Ge (2009): Ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alkylphenols in soil. *J Chromatogr A* 1216: 2499-2503.

Weinmann, W. (2001): Entwicklung und Anwendung von Hochdruckflüssigkeitschromatographie Massenspektrometrie in der forensisch toxikologischen Analytik. Medizinischen Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br., Habilitationsschrift.

Weinmann, W., M. Stoertz, S. Vogt und J. Wendt (2001): Tune compounds for electrospray ionization/in-source collision-induced dissociation with mass spectral library searching. *J Chromatogr A* 926: 199-209.

Wilson, N. S., J. W. Dolan, L. R. Snyder, P. W. Carr und L. C. Sander (2002a): Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography III. The physico-chemical basis of selectivity. *J Chromatogr A* 961: 217-236.

Wilson, N. S., J. Gilroy, J. W. Dolan und L. R. Snyder (2004): Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography - VI. Columns with embedded or end-capping polar groups. *J Chromatogr A* 1026: 91-100.

Wilson, N. S., M. D. Nelson, J. W. Dolan, L. R. Snyder und P. W. Carr (2002b): Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in conditions. *J Chromatogr A* 961: 195-215.

Wilson, N. S., M. D. Nelson, J. W. Dolan, L. R. Snyder, R. G. Wolcott und P. W. Carr (2002c): Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography I. A general quantitative relationship. *J Chromatogr A* 961: 171-193.

Wolfender, J.-L., K. Ndjoko und K. Hostettmann (2001): The potential of LC-NMR in phytochemical analysis. *Phytochem Anal* 12: 2-22.

Zedda, M., J. Tuerk, S. Peil und T. C. Schmidt (2010): Determination of polymer electrolyte membrane (PEM) degradation products in fuel cell water using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24: 3531-3538.

Zedda, M., J. Tuerk, T. Teutenberg, S. Peil und T. C. Schmidt (2009): A strategy for the systematic development of a liquid chromatographic mass spectrometric screening method for polymer electrolyte membrane degradation products using isocratic and gradient phase optimized liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1216: 8910-8917.

Zwiener, C. (2004): Gekoppelte Massenspektrometrie für die Wasseranalyse. *Nachr Chem* 52: 156-159.

## 9 Anhang

Tabelle 45: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	CAS-Nummer	Reinheit
Acetonitril	Promochem	75-05-8	min. 99,9 % (LC/MS)
Aflatoxin B1	Sigma Aldrich	1162-65-8	≥98% (TLC and HPLC)
Ammoniumacetat	Biosolve	631-61-8	(ULC/MS)
Ammoniumformiat	Biosolve	540-69-2	(ULC/MS)
Chloroform	Promochem	67-66-3	für Rückstandsanalysen
Citrinin	Iris Biotech	518-75-2	>99%
Deoxynivalenol	Iris Biotech	51481-10-8	>99%
Diacetoxyscirpenol	Sigma Aldrich	2270-40-8	
Dichlormethan	Promochem	75-09-2	min 99,5 % (für Rückstandsanalysen)
Essigsäure	Biosolve	64-19-7	min. 96 % (ULC/MS)
Glilotoxin	Iris Biotech	67-99-2	>99.9%
Methanol	Promochem	67-56-1	min. 99,9 % (LC/MS)
Ochratoxin A	Iris Biotech	303-47-9	>99%
Roridin A	Iris Biotech	14729-29-4	99%
Sterigmatocystin	Iris Biotech	10048-13-2	>99.9%
Stickstoff	Praxair	7727-37-9	für Kühlzwecke
Wasser	Promochem	7732-18-5	min. 99 % (LC/MS)

Tabelle 46: Liste der verwendeten Geräte

Name	Hersteller	Funktion
3200 Q Trap	AB Sciex	MS/MS-Gerät
1200 Series	Agilent	HPLC-System
AJ 150	Mettler	Analysenwaage
CBM-20A	Shimadzu	Kontrollgerät
CG840 B	Schott	pH-Meter
CTO-20AC	Shimadzu	Säulenofen
DGU-20A <sub>3</sub>	Shimadzu	Degaser
EL3002-IC	Mettler Toledo	Waage
Express LC-100	Eksigent	Kapillar-HPLC-System
HTS PAL	CTC Analytics	Autosampler
Injekt	Braun	5 mL-Einwegspritze
Kühlmobil	Van der Heijden	Kühlwasserkühlung
LC-20AD	Shimadzu	Lösemittelpumpen A und B
Luna	Phenomenex	Trennsäule (L·Ø: 50 mm · 2 mm, Partikelgröße: 2,5 µm)
Luna	Phenomenex	Trennsäule (L·Ø: 150 mm · 2 mm, Partikelgröße: 3 µm)
Maxis	Bruker Daltonic	QTOF-MS
Mini	AµMass	Säulenofen
N035.3 AN 18	KNF Neuberger	Vakuumpumpe
N726.3 FT. 18	KNF Neuberger	Vakuumpumpe
Pursuit XR <sub>s</sub> C18	Varian	Trennsäule (L·Ø: 150 mm · 2,0 mm, Partikelgröße: 5 µm)
RC-45/15 MS	Macherey-Nagel	Spritzenvorsatzfilter (Porenweite 0,45 µm)

Name	Hersteller	Funktion
RK 1028 H	Bandelin	Ultraschallbad
Rotovapor R-114	Büchi	Rotationsverdampfer
Security guard C18	Phenomenex	Vorsäule 4 · 2,0 mm
SIL-20AC	Shimadzu	Autosampler
Spe-12G	J.T. Baker	SPE-Aquarium
Synergi Fusion-RP	Phenomenex	Trennsäule (L·Ø: 100 mm · 0,3 mm, Partikelgröße: 2,5 µm)
	PALL Life	
Type A/E; P/N 61631	Sciences	Glasfaserfilter
Unique HT	Leco	TOF-MS
Vakuum Controller 168	Büchi	Vakuumkontrolleinheit
vapo therm basis mobil I	Barkery	Stickstoffbrücke
vapo therm basis mobil I	Barkery	Temperaturregler
Waterbath B480	Büchi	Wasserbad
XS 105	Mettler Toledo	Analysenwaage

Tabelle 47: Analytische Kenndaten der Methode zur Quantifizierung von acht Mykotoxinen im Hausstaub mittels HPLC-Hybridmassenspektrometer

Analyt	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß $r^2$	Reststandardabweichung $S_y$	Verfahrensstandardabweichung $S_x$
Aflatoxin B1	$y = 1685,2 \cdot x + 561,8$	0,999	143,2	0,085
Diacetoxyscirpenol	$y = 689,1 \cdot x + 315$	0,991	196,0	0,284
Gliotoxin	$y = 497,8 \cdot x + 16,8$	0,995	99,74	0,200
Roridin A	$y = 1933,5 \cdot x + 134,8$	0,998	249,7	0,129
Ochratoxin A	$y = 1751,4 \cdot x - 190$	0,998	239,1	0,137
Sterigmatocystin	$y = 1081,4 \cdot x + 34,7$	0,999	102,2	0,094
Deoxynivalenol	$y = 60,1 \cdot x - 133,2$	0,992	13,79	0,229
Citrinin	$y = 10453 \cdot x + 3991$	0,993	2830	0,271

Tabelle 48: Wiederfindungsraten für die Quantifizierung von acht Mykotoxinen im Hausstaub mittels HPLC-MS/MS berechnet nach Matuszewski et al. (2003); Messtag 1

	Aflatoxin B1	Diacetoxyscirpenol	Ochratoxin A	Sterigmatocystin	Gliotoxin	Roridin A	Deoxynivalenol	Citrinin
Poolstaub + 40 ng/mL vor Ex. 1	18,3	23,6	29	38,3	19,4	27,9	12,8	14,9
Poolstaub + 40 ng/mL vor Ex. 2	18,3	23,1	28,3	38	18,8	27,8	14,2	11,6
Poolstaub + 40 ng/mL vor Ex. 3	18,1	23	29,5	38,3	19,4	28,3	14,9	11,6
Mittelwert	18,2	23,2	28,9	38,2	19,2	28,0	14,0	12,7
Standardabweichung	0,115	0,321	0,603	0,173	0,346	0,265	1,069	1,905
Relative Standardabweichung [%]	0,6	1,4	2,1	0,5	1,8	0,9	7,7	15,0
Extraktionswiederfindung (RE) [%]	130,5	117,1	111,9	149,0	109,5	122,1	72,2	107,9
Prozesswiederfindung (PE) [%]	45,6	58,1	72,3	95,5	48,0	70,0	34,9	31,8
Poolstaub + 60 ng/mL vor Ex. 1	25,4	32,1	43,8	49,7	30,4	40,3	19	22,3
Poolstaub + 60 ng/mL vor Ex. 2	25,3	32,6	44,5	50,3	29,8	43	20,4	18,7
Poolstaub + 60 ng/mL vor Ex. 3	25,3	32,1	42,7	50	29,6	43,4	17,9	17,3



	<b>Afla- toxin B1</b>	<b>Dia- ceto- xy- scir- pe- nol</b>	<b>Och- ra- toxin A</b>	<b>Ste- rig- ma- to- cysti n</b>	<b>Glio- toxin</b>	<b>Ror- idin A</b>	<b>Deo- xy- niva- lenol</b>	<b>Cit- rinin</b>
Mittelwert	25,3	32,3	43,7	50,0	29,9	42,2	19,1	19,4
Standardabweichung	0,058	0,289	0,907	0,300	0,416	1,686	1,253	2,579
Relative Standardabweichung [%]	0,2	0,9	2,1	0,6	1,4	4,0	6,6	13,3
Extraktionswiederfindung (RE) [%]	127,9	116,5	112,3	141,6	135,6	118,9	93,9	114,3
Prozesswiederfindung (PE) [%]	42,2	53,8	72,8	83,3	49,9	70,4	47,8	48,6
Poolstaub + 80 ng/mL vor 1	32,7	40,3	59	66,1	41,8	55	18	26,5
Poolstaub + 80 ng/mL vor 2	32,6	40,2	60,7	65,5	42,4	55,8	19,9	25,7
Poolstaub + 80 ng/mL vor 3	32	40,5	50,6	64,8	43,1	55,5	18,9	21,4
Mittelwert	32,4	40,3	56,8	65,5	42,4	55,4	18,9	24,5
Standardabweichung	0,379	0,153	5,408	0,651	0,651	0,404	0,950	2,743
Relative Standardabweichung [%]	1,2	0,4	9,5	1,0	1,5	0,7	5,0	11,2
Extraktionswiederfindung (RE) [%]	116,9	105,1	110,5	127,7	129,6	113,6	88,9	108,7
Prozesswiederfindung (PE) [%]	40,5	50,4	71,0	81,8	53,0	69,3	47,3	61,3
Poolstaub + 40 ng/mL nach Ex. 1	14,1	19,7	23,9	25,6	17,6	21,1	17,8	12,9
Poolstaub + 40 ng/mL nach Ex. 2	14	19,7	26,8	25,4	17,3	23,4	21,8	11,6
Poolstaub + 40 ng/mL nach Ex. 3	13,8	20,1	26,9	25,9	17,7	24,3	18,4	10,8
Mittelwert	14,0	19,8	25,9	25,6	17,5	22,9	19,3	11,8
Standardabweichung	0,153	0,231	1,704	0,252	0,208	1,650	2,157	1,060
Relative Standardabweichung [%]	1,1	1,2	6,6	1,0	1,2	7,2	11,2	9,0
Matrixwiederfindung (ME)	34,9	49,6	64,7	64,1	43,8	57,3	48,3	29,4
Poolstaub + 60 ng/mL nach Ex. 1	19,7	28,4	38,7	34,9	22	35,4	20,4	19,4
Poolstaub + 60 ng/mL nach Ex. 2	19,8	26,6	38,6	35,7	21,5	35,7	19,4	16,2
Poolstaub + 60 ng/mL nach Ex. 3	19,9	28,1	39,4	35,3	22,7	35,5	21,2	15,4
Mittelwert	19,8	27,7	38,9	35,3	22,1	35,5	20,3	17,0
Standardabweichung	0,100	0,964	0,436	0,400	0,603	0,153	0,902	2,117
Relative Standardabweichung [%]	0,5	3,5	1,1	1,1	2,7	0,4	4,4	12,5
Matrixwiederfindung (ME)	33,0	46,2	64,8	58,8	36,8	59,2	33,9	28,3
Poolstaub + 80 ng/mL nach Ex. 1	27,7	37,4	51,2	51,1	32,7	44,7	20,3	24,6
Poolstaub + 80 ng/mL nach Ex. 2	27,6	37,8	51,9	51,2	32,9	44,5	20,7	21,8
Poolstaub + 80 ng/mL nach Ex. 3	27,9	39,9	51	51,5	32,6	57,2	22,9	21,3
Mittelwert	27,7	38,4	51,4	51,3	32,7	48,8	21,3	22,6
Standardabweichung	0,153	1,343	0,473	0,208	0,153	7,275	1,400	1,779
Relative Standardabweichung [%]	0,6	3,5	0,9	0,4	0,5	14,9	6,6	7,9
Matrixwiederfindung (ME)	34,7	48,0	64,2	64,1	40,9	61,0	26,6	28,2
Mittlere (ME) [%]	29,8	41,7	55,9	54,5	35,6	51,3	36,3	28,7
Mittlere (RE) [%]	125,1	112,9	111,5	139,5	124,9	118,2	85,0	110,3
Mittlere (PE) [%]	42,8	54,1	72,0	86,9	50,3	69,9	43,3	47,2

Tabelle 49: Wiederfindungsraten für die Quantifizierung von acht Mykotoxinen im Hausstaub mittels HPLC-MS/MS berechnet nach Matuszewski et al. (2003), Messtag 2

	<b>Afla- toxin B1</b>	<b>Diace- toxy- scirpe- nol</b>	<b>Ochra- toxin A</b>	<b>Sterig- ma- tocystin</b>	<b>Glio- toxin</b>	<b>Ror- idin A</b>	<b>Deo- xy- niva- lenol</b>	<b>Cit- rinin</b>
Poolstaub + 40 ng/mL vor Ex. 1	28	19,1	29,3	38,1	33,7	27,1	10,1	31,1
Poolstaub + 40 ng/mL vor Ex. 2	30,9	23,7	33,4	37,1	37,4	33	10,4	25,7
Poolstaub + 40 ng/mL vor Ex. 3	18,4	17	23,8	37,4	27,5	25	9,93	13,8
Mittelwert	25,8	19,9	28,8	37,5	32,9	28,4	10,1	23,5
Standardabweichung	6,542	3,427	4,817	0,513	5,002	4,148	0,238	8,851
Relative Standardabweichung [%]	25,4	17,2	16,7	1,4	15,2	14,6	2,3	37,6
Extraktionswiederfindung (RE) [%]	157,1	108,5	98,1	122,8	138,9	114,2	93,3	118,5
Prozesswiederfindung (PE) [%]	64,4	49,8	72,1	93,8	82,2	70,9	25,4	58,8
Poolstaub + 60 ng/mL vor Ex. 1	29,5	27,8	43,3	55,4	37,5	43,6	14,6	41,9
Poolstaub + 60 ng/mL vor Ex. 2	35,6	31,3	45,3	57,8	46,4	46	15	26,3
Poolstaub + 60 ng/mL vor Ex. 3	33,2	28,9	45,5	57,4	41,9	46,2	15,1	28,6
Mittelwert	32,8	29,3	44,7	56,9	41,9	45,3	14,9	32,3
Standardabweichung	3,073	1,790	1,217	1,286	4,450	1,447	0,265	8,422
Relative Standardabweichung [%]	9,4	6,1	2,7	2,3	10,6	3,2	1,8	26,1
Extraktionswiederfindung (RE) [%]	135,2	113,1	115,0	162,2	139,6	138,6	82,0	107,0
Prozesswiederfindung (PE) [%]	54,6	48,9	74,5	94,8	69,9	75,4	37,3	80,7
Poolstaub + 80 ng/mL vor 1	46	39,2	62,9	67,5	52,1	56,7	19	63,7
Poolstaub + 80 ng/mL vor 2	42	36,2	58,5	68,5	46,8	52,2	19,1	38,9
Poolstaub + 80 ng/mL vor 3	36,2	37,6	58,9	66,6	44,6	54,5	18,5	30,5
Mittelwert	41,4	37,7	60,1	67,5	47,8	54,5	18,9	44,4
Standardabweichung	4,927	1,501	2,433	0,950	3,855	2,250	0,321	17,26
Relative Standardabweichung [%]	11,9	4,0	4,0	1,4	8,1	4,1	1,7	38,9
Extraktionswiederfindung (RE) [%]	133,4	115,8	114,3	136,5	110,0	114,2	93,6	106,5
Prozesswiederfindung (PE) [%]	51,8	47,1	75,1	84,4	59,8	68,1	47,2	110,9
Poolstaub + 40 ng/mL nach Ex. 1	17,4	16,6	28,6	29,2	25,9	23,7	10,2	23,8
Poolstaub + 40 ng/mL nach Ex. 2	18,8	22,9	33,6	32,3	25,2	26,1	11	16,4
Poolstaub + 40 ng/mL nach Ex. 3	13	15,6	26	30,2	19,9	24,7	11,4	19,4
Mittelwert	16,4	18,4	29,4	30,6	23,7	24,8	10,9	19,9
Standardabweichung	3,027	3,958	3,863	1,582	3,281	1,206	0,611	3,722
Relative Standardabweichung [%]	18,5	21,5	13,1	5,2	13,9	4,9	5,6	18,7
Matrixwiederfindung (ME)	41,0	45,9	73,5	76,4	59,2	62,1	27,2	49,7
Poolstaub + 60 ng/mL nach Ex. 1	26,8	26,2	41,2	35,8	28,9	35,3	18,8	45,2
Poolstaub + 60 ng/mL nach Ex. 2	22,1	25,8	38,8	34,9	34,1	33	17,2	26,2
Poolstaub + 60 ng/mL nach Ex. 3	23,8	25,8	36,6	34,5	27,1	29,7	18,5	19,1
Mittelwert	24,2	25,9	38,9	35,1	30,0	32,7	18,2	30,2
Standardabweichung	2,380	0,231	2,301	0,666	3,635	2,815	0,850	13,49
Relative Standardabweichung [%]	9,8	0,9	5,9	1,9	12,1	8,6	4,7	44,7
Matrixwiederfindung (ME)	40,4	43,2	64,8	58,4	50,1	54,4	30,3	50,3
Poolstaub + 80 ng/mL nach Ex. 1	34,2	37,5	53,6	52,8	46,1	49,9	19,7	61,5
Poolstaub + 80 ng/mL nach Ex. 2	27,7	29	49,5	41,7	43,4	45,1	19,4	35
Poolstaub + 80 ng/mL nach Ex. 3	31,2	31,1	54,6	53,9	41	48,1	21,4	28,5
Mittelwert	31,0	32,5	52,6	49,5	43,5	47,7	20,2	41,7
Standardabweichung	3,253	4,428	2,702	6,749	2,551	2,425	1,079	17,48
Relative Standardabweichung [%]	10,5	13,6	5,1	13,6	5,9	5,1	5,3	42,0

	<b>Afla- toxin B1</b>	<b>Diace- toxy- scirpe- nol</b>	<b>Ochra- toxin A</b>	<b>Sterig- ma- tocystin</b>	<b>Glio- toxin</b>	<b>Ror- idin A</b>	<b>Deo- xy- niva- lenol</b>	<b>Cit- rinin</b>
Matrixwiederfindung (ME)	38,8	40,7	65,7	61,8	54,4	59,6	25,2	52,1
Mittlere (ME) [%]	34,7	37,5	59,4	57,8	47,9	51,5	27,6	50,7
Mittlere (RE) [%]	141,9	112,5	109,1	140,5	129,5	122,3	89,6	110,6
Mittlere (PE) [%]	56,9	48,6	73,9	91,0	70,6	71,5	36,6	83,5

Tabelle 50: Fragebogen

Fragebogen zur Erhebung von Informationen zum Gebäude und zur Nutzung (5 Seiten). Die erste Seite mit den persönlichen Angaben wurde getrennt aufbewahrt. Die übrigen Angaben wurden über eine Probennummer anonymisiert ausgewertet.

# Forschungsstudie zu Schimmelpilzgiften im Hausstaub

Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA)  
Bliersheimer Str. 60  
47229 Duisburg

**Kontakt:**  
**Christoph Portner**  
**Telefon: 02065/ 418-216**  
**Fax: 02065/ 418-211**  
**Hausstaub@iuta.de**

Datum: \_\_\_\_\_ Probennehmer: \_\_\_\_\_ Probe-Nr. \_\_\_\_\_

## 1 Allgemeine Angaben

Name: \_\_\_\_\_  
Objektanschrift: \_\_\_\_\_  
Telefon: \_\_\_\_\_  
Email: \_\_\_\_\_

**1.1 Probenahmestelle:**

Wohnhaus  Mietwohnung  Öffentliches Gebäude/ Firma

Bemerkung: \_\_\_\_\_

**1.2 Welches Stockwerk?**  Souterrain, Keller  Erdgeschoss  \_\_\_ Obergeschoss

**1.3 Befinden sich in unmittelbarer Umgebung des Gebäudes (bis max. 500 m):**

Geschlossene Bebauung  Landwirtschaftliche Nutzflächen  Komposthaufen

Mülltonnen  Park  Friedhof  Kompostierwerk oder Mülldeponie

Genauere Beschreibung: \_\_\_\_\_

**1.4 Um was für einen Typ Haus handelt es sich?**

Ein- oder Zweifamilienhaus, freistehend  Reihenhaushaus

Mehrfamilienhaus bis 5 Etagen  Mehrfamilienhaus mit mehr als 5 Etagen

Öffentliches Gebäude/ Firma

Anderes: Bitte Beschreibung \_\_\_\_\_

**2. Schimmelvorkommen allgemein**

**2.1 Trat schon einmal Schimmelbefall auf?**  ja  nein

Wenn ja, wann und wo: \_\_\_\_\_

**2.2 Wurde schon einmal Schimmelbefall bekämpft?**  ja  nein

Wenn ja, wann, wie und durch wen: \_\_\_\_\_

**2.3 Wurden fungizide Farben, Sprays etc. benutzt?**  ja  nein

Wenn ja, wann, wie und durch wen: \_\_\_\_\_

**3 Angaben Räume/ Gebäude****3.1 Gebäude allgemein**

**3.1.1 In welchem Jahr wurde das Gebäude erbaut?** Jahreszahl (ungefähre Angabe) |\_|\_|\_|\_|

**3.1.2 Zeitpunkt des Einzuges in die Wohnung:** Monat |\_|\_| Jahr |\_|\_|\_|\_|

**3.1.3 Wurden umfangreiche bauliche Veränderungen vorgenommen (z. B. Innen-/Außendämmung)?**

Wenn ja, wann und welche: \_\_\_\_\_

**3.2 Weist das Haus eine der folgenden baulichen Besonderheiten auf?**

Energiesparhaus/ Niedrigenergiehaus  Öko-Haus (z.B. Holzhaus)

Flachdachhaus  Fertighaus

Bauernhaus mit direkt angebautem Stallgebäude, in dem Tiere gehalten werden

Bauernhaus (mit Stallgebäude), mit früherer Tierhaltung

Anderes: Bitte Beschreibung \_\_\_\_\_

**3.3 Lage der Räume im Gebäude**

**3.3.1 Ist das Haus unterkellert?**  ja  nein

Wenn ja:  voll unterkellert  teilweise unterkellert

Bemerkungen: \_\_\_\_\_

**3.3.2 Was befindet sich unter der Wohnung?**

Bewohnte Wohnung  unbewohnte Wohnung  Souterrain, Keller

Fundament, Erde Bemerkungen: \_\_\_\_\_

**3.3.3 Was befindet sich oberhalb der Decke der Wohnung?**

Bewohnte Wohnung  unbewohnte Wohnung  Dachboden  Flachdach  Dachschrägen

Bemerkungen: \_\_\_\_\_

**3.4 Bauwerksmängel:**

- Risse im Putz  mangelhafte Verfugung  Salzausblühungen  
 defekte Regenrinne / -fallrohre bzw. Dachziegel  feuchte Stellen  
 Anderes: Bitte Beschreibung \_\_\_\_\_

**3.5 Art der Fenster:**

- Einscheibenfenster  Kastendoppel- / 2-Rahmenfenster  
 Isolierverglasung, Thermofenster, Schallschutzfenster

Bemerkungen: \_\_\_\_\_

**3.6 Womit ist der Fußboden in der Wohnung belegt? Bei Pilzbefall im betroffenen Raum:**

- Stein, Fliesen, Estrich  
 Parkett, Kork, Stirnholz, Laminat Fugenbreite: \_\_\_\_\_ mm Versiegelt mit: \_\_\_\_\_  
 Linoleum, PVC, etc.  kurzfloriger Teppichboden  hochfloriger Teppichboden  
 lose Teppiche ( m<sup>2</sup> ) \_\_\_\_\_  
 Anders: Bitte Beschreibung: \_\_\_\_\_

**3.7 Material der Wände? Bei Pilzbefall im betroffenen Raum?**

- Raufaser  Vinyl  Putz  Tapete  Holz  Gipskarton  
 Anders: Bitte Beschreibung \_\_\_\_\_

**4 Raumnutzung allgemein****4.1 Wohnungsnutzer und ihre Aktivitäten:**

**4.1.1 Personenzahl:** \_\_\_\_\_ davon Raucher, die im Innenraum rauchen: \_\_\_\_\_

**4.1.2 Geruchswahrnehmung (modrig, muffig):**  ja  nein

Bemerkungen: \_\_\_\_\_

**4.2 Boden- und Wandbündigkeit von Möbeln an Außenwänden des betroffenen Raumes**

**4.2.1 Sind Einbauschränke vorhanden?**  ja  nein

**4.2.2 Ist ein Abstand von mindestens 5 cm zwischen Außenwänden und Möbelstück(en)?**

ja  nein

**4.3 Haustiere**

**4.3.1 Gibt es Haustiere in der Wohnung?**  ja  nein

Wenn ja, welche? \_\_\_\_\_

**4.3.2 Gab es in der Vergangenheit Haustiere in der Wohnung?**  ja  nein

Wenn ja, welche? \_\_\_\_\_

**4.4 Wird häufig Obst und Gemüse in der Wohnung gelagert?**  ja  nein

Wenn ja, wo und wieviel: \_\_\_\_\_

**4.5 Wird in der Wohnung gekocht?**  ja  nein

**5. Reinigungsgewohnheiten / Müllentsorgung**

**5.1 Wird Biomüll in der Wohnung gesammelt?**  ja  nein

**5.2 Wird Wertstoffmüll z.B. „gelber Sack“-Müll in der Wohnung gesammelt?**  ja  nein

**5.3 Wird Restmüll in der Wohnung gesammelt?**  ja  nein

**5.4 Falls ja, wie lange befindet sich der Sammelbehälter gewöhnlich in der Wohnung?**

Biomüll Wertstoffmüll Restmüll

**5.4.1 weniger als 1 Woche**

**5.4.2 1 - 2 Wochen**

**5.4.3 mehr als 2 Wochen**

**5.4.5 Wie häufig wird gesaugt/ geputzt (pro Woche/ Monat)?** \_\_\_\_\_

Bemerkungen: \_\_\_\_\_

**6. Angaben zu Heizung und Lüftung****6.1 Heizung**

**6.1.1 Sind alle Räume beheizbar?**  ja  nein

**6.1.2 Werden alle Räume beheizt?**  ja  nein

Wenn nein, wird der von Schimmelpilzen befallene Raum beheizt?  ja  nein

Wenn nein, Türe gewöhnlich:  offen  zu

**6.2.1 Wird ein passiver Luftbefeuchter (mit Wasser gefüllte Gefäße, oder ein Zimmerbrunnen) verwendet?**  ja  nein**6.2.2 Wird ein aktiver Luftbefeuchter (Verdunster, Vernebler) verwendet?**  ja  nein

Wenn ja, wie häufig wird er benutzt? Anzahl der Stunden pro Tag: |\_|\_|

Anzahl der Tage pro Woche: |\_|

**6.3 Wie lüften Sie im Winter?**

selten, nie  einmal täglich für kurze Zeit durch öffnen mehrerer Fenster

mehrmals täglich für kurze Zeit durch öffnen mehrerer Fenster

über mehrere Stunden das/ die Fenster ganz öffnen

Das / die Fenster über mehrere Stunden gekippt

Bemerkungen : \_\_\_\_\_

**7. Topfpflanzen****7.1 Wie viele Topfpflanzen befinden sich in der Wohnung?**

Hydrokultur, Anzahl |\_|\_| Erdkultur, Anzahl |\_|\_|

**8. Schimmelbefall****8.1 Ist aktuell Schimmelbefall sichtbar?**

ja  nein

**8.2 Wenn ja, wie groß ist die befallene Fläche?**

ca. Postkartengröße  ca. DIN A4-Größe  ca. 1 m<sup>2</sup>  größer: ca. \_\_\_\_\_ m<sup>2</sup>

**8.3 In welchen Räumen ist der Schimmel aufgetreten?**

Möglichst genaue Beschreibung der betroffenen Räume:

\_\_\_\_\_

**8.4 Wo ist der Schimmel aufgetreten?**

Hinter Möbeln  Freie Wandfläche  Sonstiges

Möglichst genaue Beschreibung: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**8.5 Sind Fotos des Schimmelschadens vorhanden?**  ja  nein

Wenn ja, genaue Beschreibung: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**9. Alter des Hausstaubes :**

**9.1 Bei Abgabe des eigenen Staubbeutel:** ungefährender Zeitraum der Nutzung des Beutels in Tagen: \_\_\_\_\_

**9.2 Bei Probenahme vom IUTA:** Zeitpunkt der letzten Grundreinigung in Tagen: \_\_\_\_\_

**9.3 Anzahl und Art aller Proben.** Bitte genau beschreiben:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**9.4 Art des Staubsauger-Beutels:**  Papier  Vlies

Vlies mit hygienischer Ausstattung  Vlies mit integriertem HEPA-Filter

Bemerkungen : \_\_\_\_\_

**9.5 Wurde der Staubsauger ausschließlich im Innenraum benutzt?**  ja  nein

Wenn nein, wo wurde noch gesaugt (z. B. Auto, Balkon, Terrasse): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**10. Sonstige Informationen, Bemerkungen**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Zudem erkläre ich, dass diese Dissertation sowohl in ihrer Gesamtheit als auch in Teilen keiner anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt und vorgelegen hat.

Rheinberg, 01.12.2011

Christoph Portner



## Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne Unterstützungen nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich bei allen Studienteilnehmern, -helfern und -förderern recht herzlich bedanken. Besonderer Dank gilt Prof. Werner Butte, Dr. Jochen Boosfeld, Dr. Mike Duisken, Prof. Manfred Gareis, Prof. Wolfgang Hoffmann, Dr. Thekla Kiffmeyer, Martin Kläßen, Dr. Volker Plegge, Dr. Burkhard Stahlmecke, Martin Schwan, Dr. Verena Tellström, Dr. Thorsten Teutenberg, Dr. Ilka Toepfer, Dr. Jochen Türk, Norbert Wenkel, Dr. Marco Zedda und meiner Familie.

Die präsentierten Daten wurden durch ein öffentlich gefördertes Forschungsvorhaben ermöglicht. Für die finanzielle Unterstützung vom Ministerium für Wirtschaft, Mittelstand und Energie des Landes Nordrhein-Westfalen (FKZ 005-0501-009) möchte ich mich ebenfalls bedanken.

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN:

**NAME:** Christoph Portner  
**GEBURTSDATUM:** 08. 03. 1975  
**GEBURTSORT:** Duisburg  
**FAMILIENSTAND:** verheiratet, 1 Tochter (7 Jahre)

### PROMOTION:

04/2007 – 12/2011 Promotionsstudium an der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg  
  
Betreuer: apl. Prof. Dr. Werner Butte  
  
Thema: Entwicklung flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub

### STUDIUM:

09/1997 - 09/2001 Chemiestudium an der Gerhard- Mercator- Universität- Duisburg  
  
10/2001 - 09/2004 Internationaler Bachelor- Studiengang Wasser: Chemie, Analytik, Mikrobiologie an der Universität Duisburg-Essen; Abschluss als Bachelor of Science  
  
04 - 09/2004 Bachelorarbeit bei der Thyssen Krupp Stahl AG in Duisburg über die Vergleichbarkeit von konventionellen mit mikro-wellen-unterstützten Aufschlussverfahren in der Wasser-analytik  
  
10/2004 - 09/2006 Masterstudium Water Science an der Universität Duisburg-Essen; Abschluss als Master of Science  
  
03 - 09/2006 Masterarbeit bei der Dr. Oetker KG in Moers über die Optimierung der Trinkwasseraufbereitung eines Lebensmittelbetriebes - Validierung einer Pilotanlage zur Trinkwasserdesinfektion mittels Elektrodialyse

**BERUFLICHE ERFAHRUNG:**

- 02/1995 - 09/1995      Befristete Übernahme bei der Thyssen Stahl AG in Duisburg als Chemielaborant in der Prozessanalytik
- 07/2001 - 07/2009      Nebentätigkeit vornehmlich am Wochenende im Chemisch-mikrobiologischen Labor der Dr. Oetker Frischeprodukte KG in Moers
- 03 - 04/2003            Mitarbeit im Aufbau des Praktikums analytische Chemie an der Universität Duisburg- Essen
- Seit 12/2006            Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA) in Duisburg

**SCHULE, BERUFS-AUSBILDUNG UND ZIVILDIENTST:**

- 08/1985 - 08/1991      Gustav- Stresemann- Realschule in Duisburg; Fachoberschulabschluss
- 09/1991 - 01/1995      Berufsausbildung bei der Thyssen Stahl AG in Duisburg zum Chemielaboranten
- 09/1995 - 07/1996      Robert- Bosch- Kollegschule in Duisburg; Fachhochschulreifeabschluss
- 08/1996 - 08/1997      Zivildienst im St. Joseph Hospital in Duisburg