

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tierhygiene

LC-MS/MS-Nachweismethoden für Typ A, B und D
Trichothecene und deren Anwendung in der
Lebensmittel- und Umweltanalytik

Christoph Gottschalk

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer

2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 24.11.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.05.2009 angenommen.

MEINEN ELTERN UND GROBELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Literatur.....	3
2.1	Trichothecen-Stoffspektrum.....	3
2.2	Toxizität	6
2.3	Bedeutung als Lebensmittelkontaminanten	8
2.4	Bedeutung als Kontaminanten in Innenräumen	9
3	Material und Methoden	11
3.1	Probenahme	11
3.1.1	Lebensmittelproben.....	11
3.1.2	Baumaterial- und Luftproben	11
3.2	Herstellung von Standardsubstanzen makrozyklischer Trichothecene.....	12
3.3	Nachweis von Typ A, B und D Trichothecenen in Cerealien.....	15
3.3.1	Probenvorbereitung	15
3.3.2	LC-MS/MS Analytik.....	17
3.3.3	Methodenvalidierung	20
3.4	Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen in Baumaterialien und Luftproben.....	21
3.4.1	Probenvorbereitung	21
3.4.2	LC-MS/MS Analytik.....	22
3.4.3	Methodenvalidierung	24

4	Ergebnisse und Diskussion.....	25
4.1	Validierungsergebnisse	25
4.2	Trichothecenbelastung von Lebensmittelproben	26
4.2.1	Risikoeinschätzung.....	33
4.2.2	Einfluss der landwirtschaftlichen Erzeugungsweise	35
4.3	Trichothecenbelastung in Innenräumen	38
4.3.1	Morphologische Charakterisierung	38
4.3.2	Nachweis makrozyklischer Trichothecene in Baumaterialien	38
4.3.3	Nachweis makrozyklischer Trichothecene in Raumluft	41
5	Zusammenfassung	43
6	Summary	45
7	Literaturverzeichnis.....	47
8	Eigene Publikationen.....	57
9	Anhang	95
	Danksagung.....	102
	Curriculum vitae.....	104

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Toxizität und Zytotoxizität ausgewählter Trichothecene.....	7
Tabelle 2: TDI-Werte einzelner Mykotoxine und deren Ausschöpfung in unterschiedlichen Verbrauchergruppen (nach SCOOP 2003).....	8
Tabelle 3: Untersuchte Lebensmittelproben	11
Tabelle 4: LC-MS/MS Parameter zur Fraktionierung makrozyklischer Trichothecene	12
Tabelle 5: Gradientenprogramm (linear) der Analysenmethode für Typ A, B und D Trichothecene	18
Tabelle 6: Gradientenprogramm (linear) der Analysenmethode für T-2 Tetraol.....	18
Tabelle 7: Gradientenprogramm (linear) der Analysenmethode für Typ D Trichothecene.....	22
Tabelle 8: Kontaminationsraten und Gehalte der wichtigsten Trichothecene in Weizen (n=130), Roggen (n=61) und Hafer (n=98).....	27
Tabelle 9: Täglicher Verzehr bestimmter Getreidesorten/-produkte durch spezielle Verbrauchergruppen	33
Tabelle 10: T-2/HT-2, DON und NIV-Gehalte diverser Matrices.....	34
Tabelle 11: Identifizierte Schimmelpilze auf Proben aus Innenräumen (n=69)	38
Tabelle 12: Vorkommen makrozyklischer Trichothecene in Baumaterialproben (n=37)	39
Tabelle 13: Verfahrenskennndaten der LC-MS/MS Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene	95
Tabelle 14: MRM-Übergänge und substanzspezifische Parameter der Multimethode für Typ D Trichothecene	96
Tabelle 15: Wiederfindungsraten für die Matrix Weizen, LC-MS/MS Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene	97
Tabelle 16: Wiederfindungsraten für die Matrix Roggen, LC-MS/MS Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene	98
Tabelle 17: Wiederfindungsraten für die Matrix Hafer, LC-MS/MS Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene	99
Tabelle 18: Morphologische Charakterisierung von Proben verschimmelter Innenraum- Materialien.....	100

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Chemische Strukturen von Typ A und B Trichothecenen (Cole <i>et al.</i> 2003).....	4
Abbildung 2: Chemische Strukturen von Typ D Trichothecenen (Cole <i>et al.</i> 2003).....	5
Abbildung 3: MRM-Chromatogramm eines Fraktionierungslaufs (oben) mit extrahierten Ionenspuren der Fragmentationen m/z 249,0 (blau) und 231,0 (rot) einzelner makrozyklischer Trichothecene.....	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufarbeitungsmethode für Cerealienproben zum Nachweis von Typ A, B und D Trichothecenen.....	16
Abbildung 5: Beispielchromatogramm der Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene sowie zugehörige MS-Parameter (MRM-Übergänge siehe Publikation 1 und 2).....	19
Abbildung 6: Beispielchromatogramm der Multimethode für Typ D Trichothecene sowie zugehörige MS-Parameter (MRM-Übergänge siehe Tabelle 14 im Anhang).....	23
Abbildung 7: Vergleich von T-2/HT-2 Gehalten (oben) und DON-Gehalten (unten) in unterschiedlichen Produktgruppen.....	29
Abbildung 8: Mehrfachbelastung von Weizen-, Roggen- und Haferproben mit Trichothecenen.....	31
Abbildung 9: Korrelation zwischen T-2 und HT-2 Gehalten in Haferproben (n=98).....	32
Abbildung 10: Ausschöpfung der TDI-Werte für T-2/HT-2, DON und NIV (Publikation 2).....	34
Abbildung 11: Vergleich der Belastung mit Typ A Trichothecenen von konventionell (n=35) und ökologisch (n=35) erzeugtem Hafer (Publikation 1).....	36
Abbildung 12: MRM-Chromatogramm von SG und SH aus einem Luftfilterextrakt (Publikation 4).....	41

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3-acDON	3-Acetyl-Deoxynivalenol
15-acDON	15-Acetyl-Deoxynivalenol
Ac	Acetylrest
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CAD	<i>Collision activated dissociation</i> (Kollisionsgas)
CE	<i>Collision energy</i>
CEP	<i>Cell entrance potential</i>
cps	<i>Counts per second</i>
CUR	<i>Curtain gas</i>
CXP	<i>Cell exit potential</i>
DacVOL	4,15-Diacetylverrucarol
DAS	4,15-Diacetoxyscirpenol
DON	Deoxynivalenol
DP	<i>Declustering potential</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
EP	<i>Entrance potential</i>
EU	Europäische Union
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
FX	Fusarenon X
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GS1	<i>Nebulizer gas</i>
GS2	<i>Heating gas</i>
HeLa	Helene-Langer-Zellen
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HT-2	HT-2 Toxin
IC	<i>Inhibitory concentration</i>
IgA/G/M	Immunglobulin A/G/M
ISV	<i>Ion spray voltage</i>
KG	Körpergewicht
LD	<i>Lethal dosis</i>
LOD	Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantification</i>)
MAS	15-Monoacetoxyscirpenol
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie

MTT	Methylthiazoltetrazolium
MVOCs	<i>Microbial volatile organic compounds</i>
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NEO	Neosolaniol
ng	Nanogramm
NIV	Nivalenol
RA	Roridin A
RE	Roridin E
RL-2	Roridin L-2
RSD	Relative Standardabweichung
<i>S.</i>	<i>Stachybotrys</i>
SBS	<i>Sick building syndrome</i>
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>
SCOOP	<i>Scientific Cooperation</i>
SF	Satratoxin F
SG	Satratoxin G
SH	Satratoxin H
SK	<i>Swine-kidney-Zellen</i>
spp.	Spezies
T-2	T-2 Toxin
T-2/HT-2	Summe von T-2 und HT-2 Toxin
TDI	<i>Tolerable daily intake</i>
TEM	Temperatur
tTDI	<i>Temporary TDI</i>
VA	Verrucarin A
VJ	Verrucarin J
VOCs	<i>Volatile organic compounds</i>
VOL	Verrucarol
WFR	Wiederfindungsrate
ZEA	Zearalenon
µg	Mikrogramm

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Trichothecene sind eine ca. 150 Metaboliten umfassende Gruppe von Mykotoxinen. Dabei handelt es sich um zyklische Sesquiterpene, die durch eine oder mehrere Epoxygruppen gekennzeichnet sind und aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in vier Gruppen eingeteilt werden (Ueno 1983a). In Lebensmitteln auf Getreidebasis spielen Trichothecene des Typs A und B die größte Rolle, die von weltweit verbreiteten Pilzen der Gattung *Fusarium* bereits auf dem Feld gebildet werden können (Krska *et al.* 2001). Eine europaweite Studie der *Scientific Cooperation* (SCOOP 2003) ergab, dass über 60 % der untersuchten Weizenproben mit dem Typ B Trichothecen Deoxynivalenol (DON) oder 20 % der Weizenproben mit T-2 kontaminiert waren. Diese Toxine wirken stark zytotoxisch, immunmodulatorisch und membranschädigend (Bennett 2003). In mehreren Stellungnahmen zur Problematik „Fusarientoxine“ hat das *Scientific Committee on Food* (SCF) der Europäischen Union (EU) daher Werte für die tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI) für die Trichothecene DON, Nivalenol (NIV) und T-2/HT-2 Toxin (HT-2) festgelegt (SCF 1998-2002). Vor allem bei der Subpopulation „Kinder und Kleinkinder“ wurden Überschreitungen dieses TDI-Werts um mehr als das Fünffache festgestellt (SCOOP 2003). Aus diesem Grund wurden seitens der EU dringend mehr Daten zum Vorkommen dieser Toxine gefordert, auf deren Grundlage gegebenenfalls die Festlegung eines Grenzwerts für T-2/HT-2 in Getreide und Getreideerzeugnissen vorgesehen ist (Verordnung (EG) 1881/2006).

Hinweise auf ein Vorkommen von Trichothecenen des Typs D, sogenannten makrozyklischen Trichothecenen, in Lebensmitteln liegen hingegen kaum vor (Krska *et al.* 2001), wobei nur wenige Analysen mit ausreichend sensitiven und selektiven Methoden durchgeführt wurden. Diese hochtoxischen Metaboliten können jedoch von *Stachybotrys* spp. auf cellulosereichen Materialien wie Tapeten oder Gipskarton nach Feuchteschäden in Innenräumen gebildet werden. In den letzten Jahren erlangten diese Toxine daher im Hinblick auf eine mögliche gesundheitsschädigende Wirkung auf den Menschen besondere Aufmerksamkeit als mögliche Auslöser des sogenannten *sick building syndrome* (SBS) und einzelner Fälle von Lungenblutungen bei Kindern (Johanning *et al.* 1996, Jarvis *et al.* 1998, Dearborn *et al.* 1999). Aufgrund der Vielzahl anderer in der Luft vorkommender Schadstoffe und der Tatsache, dass ein möglicher Übergang makrozyklischer Trichothecene in die Luft als nicht gesichert gilt (Sudakin 2003), ist ein Kausalzusammenhang zwischen dem SBS und dem Vorkommen von *Stachybotrys* spp. bisher allerdings immer noch fragwürdig (Terr 2001, Kuhn *et al.* 2003).

Ziel dieses Forschungsvorhabens war es, eine möglichst große Anzahl an bekannten und auch bisher wenig erforschten Trichothecenen in Lebensmittel- und Umweltproben zu untersuchen. Hierzu wurden zunächst zwei hochsensitive LC-MS/MS Multimethoden entwickelt und validiert, mit denen insgesamt 22 Typ A, B und D Trichothecene in unterschiedlichen Matrices bestimmt werden konnten. Daraufhin erfolgte im Bereich Lebensmittelanalytik eine Datensammlung und -bewertung in Hinblick auf folgende Schwerpunkte bzw. Fragestellungen:

- Ermittlung von repräsentativen Daten speziell zum Vorkommen von Typ A, aber auch von Typ B Trichothecenen, in Weizen, Roggen und Hafer (Probenahme nach VO (EG) 401/2006).
- Wie stark ist eine Mehrfachbelastung mit unterschiedlichen Trichothecenen auf Einzelprobenniveau ausgeprägt und gibt es Korrelationen zwischen den einzelnen Analyten?
- Kommen Typ D Trichothecene in Cerealien vor?
- Wie hoch ist die Exposition des Verbrauchers gegenüber T-2/HT-2 und anderen Trichothecenen einzuschätzen?
- Gibt es einen Einfluss der landwirtschaftlichen Erzeugungsweise auf den Toxingehalt der Proben?

Im Bereich Umweltanalytik wurden Proben von Baumaterialien und Luft aus Räumen mit Schimmelbefall untersucht. Dabei waren die folgenden Fragestellungen zu klären:

- Welche Schimmelpilze kommen in den untersuchten Innenräumen vor und wie häufig können *Stachybotrys* spp. nachgewiesen werden?
- Kommen makrozyklische Trichothecene in schimmeligen Baumaterialien (Tapeten, Gipskartonplatten) vor?
- Können diese Toxine in die Raumluft übergehen und so eine direkte inhalative Belastung des Menschen darstellen?

Im Methoden- und Ergebnisteil wird an entsprechenden Stellen auf die während dieser Arbeit entstandenen Publikationen verwiesen. Zuerst wird im Folgenden jedoch ein Literaturüberblick über das untersuchte Trichothecen-Stoffspektrum, die toxischen Eigenschaften und die Bedeutung der Trichothecene als Kontaminanten in Lebensmitteln und Innenräumen gegeben.

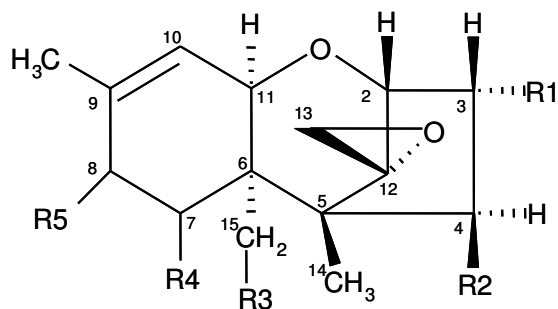
2 LITERATUR

2.1 Trichothecen-Stoffspektrum

Die Stoffgruppe der Trichothecene umfasst rund 150 Substanzen. Dabei handelt es sich um zyklische Sesquiterpene, die durch eine C-12,13-Epoxygruppe und größtenteils durch eine Doppelbindung zwischen C-9,10 gekennzeichnet sind. Allen gemeinsam ist ein trizyklisches Trichothecan-Grundgerüst, wobei sich die einzelnen Metaboliten durch die Position und Anzahl von Hydroxygruppen sowie der Art und Komplexität der Veresterungen unterscheiden. Diese Mykotoxine können von verschiedenen Pilzen der Gattungen *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium* oder *Verticimonosporium*, aber auch von Pflanzen der Gattung *Baccharis* gebildet werden (Ueno 1983a).

Aufgrund ihrer chemischen Strukturen werden Trichothecene in vier Gruppen der Typen A bis D eingeteilt, wobei nach bisherigen Erkenntnissen Typ A und B die größte Rolle als Lebensmittelkontaminanten spielen. Typ B Trichothecene wie DON sind durch eine Ketogruppe am C-8 Atom des Moleküls gekennzeichnet und werden daher auch als Ketotrichothecene bezeichnet. Typ A Trichothecene oder auch Nicht-Ketotrichothecene wie T-2 und HT-2 besitzen an dieser Stelle hingegen keine Ketogruppe (Ueno 1983a; Abbildung 1). Als Hauptproduzenten sind *Fusarium (F.) sporotrichioides* und *F. langsethiae* (Typ A) bzw. *F. culmorum* und *F. graminearum* (Typ B) bekannt (JECFA 2001, Torp *et al.* 2004, Thrane *et al.* 2004). Ein Fusarienbefall der Pflanze auf dem Feld geht dabei primär mit verschiedenen Erkrankungen wie der Taubährigkeit bei Getreide (*Fusarium* head blight) oder der Kolbenfäule bei Mais (*Giberella* ear rot) einher, welche zu vermindertem Wuchs und zu starken Ertragseinbußen führen können (Bottalico *et al.* 2002).

Typ C-Trichothecene besitzen eine weitere Epoxygruppe. Diese kann beispielsweise, wie beim *Cephalosporium*- oder *Trichothecium*-Metabolit Crotocin, zwischen C-7,8 oder, wie bei Baccharin, das von der Pflanze *Baccharis megapotamica* synthetisiert werden kann, zwischen C-9,10 positioniert sein.



Trichothecene Typ A						
	MW	R1	R2	R3	R4	R5
T-2 Toxin	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2 Toxin	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Triol	382	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Tetraol	298	OH	OH	OH	H	OH
15-Monoacetoxyscirpenol	324	OH	OH	OAc	H	H
4,15-Diacetoxyscirpenol	366	OH	OAc	OAc	H	H
Neosolaniol	382	OH	OAc	OAc	H	OH
4,15-Diacetylverrucarol	350	OH	OAc	OAc	H	H
Verrucarol	266	OH	OH	OH	H	H
Trichothecene Typ B						
Deoxynivalenol	296	OH	H	OH	OH	O
3-Acetyl-Deoxynivalenol	338	OAc	H	OH	OH	O
15-Acetyl-Deoxynivalenol	338	OH	H	OAc	OH	O
Nivalenol	312	OH	OH	OH	OH	O
Fusarenon X	354	OH	OAc	OH	OH	O

Abbildung 1: Chemische Strukturen von Typ A und B Trichothecen (Cole *et al.* 2003)

Trichothecene des Typs D, Metaboliten der Gattungen *Stachybotrys* spp. bzw. *Myrothecium* spp., sind hingegen durch ein makrozyklisches Ringsystem zwischen C-4 und C-15 charakterisiert (Abbildung 2). *Stachybotrys* spp. sind saprophytär wachsende Pilze, die weltweit auf cellulosereichen, welkenden oder abgestorbenen Pflanzenteilen vorkommen (Jarvis *et al.* 1983). Es wird angenommen, dass deren Toxine in Lebensmitteln eher selten auftreten (Krska *et al.* 2001, WHO 1990).

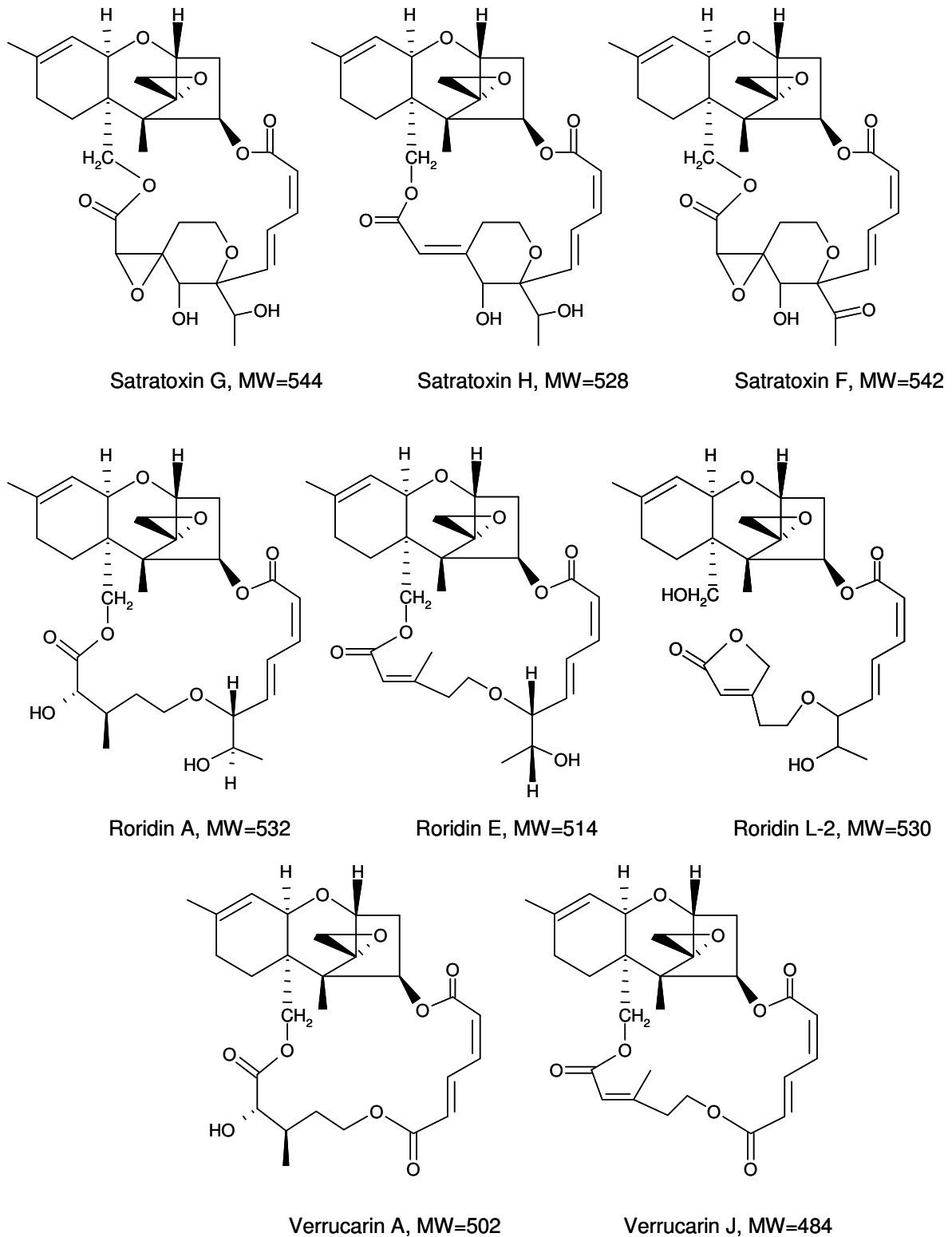


Abbildung 2: Chemische Strukturen von Typ D Trichothecenen (Cole *et al.* 2003)

Stattdessen wurden makrozyklische Trichothecene bereits vor über 30 Jahren als Auslöser der sogenannten Stachybotryotoxikose identifiziert, einer vor allem bei Pferden nach Verzehr von verschimmeltem Heu oder Stroh auftretenden, schweren Erkrankung, die mit Nekrosen der Schleimhäute bis hin zu tödlichen Hämorrhagien einhergeht (Eppley *et al.* 1973). Bezüglich einer gesundheitsschädigenden Wirkung auf den Menschen haben makrozyklische Trichothecene in den letzten Jahren vor allem als Kontaminanten von Innenräumen besonderes Interesse erlangt, da *Stachybotrys* spp. aufgrund ihrer cellulolytischen Eigenschaften gut auf feuchten Tapeten oder Gipskartonplatten wachsen können (Johanning *et al.* 1996).

2.2 Toxizität

Trichothecene gelten als stark zytotoxisch, immunmodulatorisch und membranschädigend. Verantwortlich für deren Toxizität ist dabei vor allem die Epoxygruppe in Position C-12,13. So sind Trichothecene in der Lage, an die 60S-Untereinheit der Ribosomen zu binden und durch eine Interaktion mit der Peptidyltransferase einen stark hemmenden Effekt auf die Proteinbiosynthese sowohl in der Initiations-, Elongations- als auch Terminalphase auszuüben, was sich in Folge auch auf die RNA/DNA-Synthese auswirkt (Feinberg *et al.* 1989, Rocha *et al.* 2005). Die biologische Aktivität der einzelnen Trichothecene wird dabei von deren unterschiedlichen funktionellen Gruppen bestimmt (Bennett *et al.* 2003). Beispielsweise hängt die Toxizität der Typ A Trichothecene vom Vorhandensein der Isovalerylgruppe an C-8 sowie der Acetylgruppen an C-3, C-4 und C-15 ab (Babich *et al.* 1991). Diese verringert sich mit zunehmender Deacetylierung (T-2 > HT-2 > NEO > T-2 Triol > T-2 Tetraol). Hanelt *et al.* (1994) stellten durch Zytotoxizitätstests (MTT-Zellkulturtest) fest, dass T-2 gegenüber porcinen Nierenzellen (SK-Zellen) etwa 60 Mal toxischer war als T-2 Tetraol. Typ D Trichothecene wie das Roridin A wiesen gegenüber diesem Zelltyp eine nochmals 20-fach höhere Toxizität als T-2 auf (Gareis *et al.* 2006, Tabelle 1). Diese binden im Gegensatz zu den einfachen Trichothecenen irreversibel an die Ribosomen (Hernández *et al.* 1982). Außerdem scheint auch die Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 einen Einfluss auf die Toxizität der Trichothecene zu haben, da nach deren Reduktion eine Toxizitätsabnahme beobachtet worden ist (McLaughlin *et al.* 1977). Weitere Daten zur Toxizität und Zytotoxizität ausgewählter Trichothecene sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Toxizität und Zytotoxizität ausgewählter Trichothecene

Metabolit	LD ₅₀ [mg/kg KG]		IC ₅₀ [µg/ml]	
	Maus, intraperitoneal ¹	HeLa-Zellen ¹	SK-Zellen ³	Humane Lymphozyten ⁴
Roridin A	0,5	0,003	0,001	-
Verrucarin A	0,5	0,005	0,005	-
Satratoxin G	1,2 ²	-	0,007	-
Fusarenon X	3,4	0,1	-	-
Nivalenol	4,1	0,3	2,0	0,106
T-2 Toxin	5,2	0,01	0,02	0,0006
Diacetoxyscirpenol	23	0,01	-	0,001
3-Acetyl-Deoxynivalenol	49	10	-	-
Deoxynivalenol	70	1,0	17	0,124

¹Ueno 1983a, ²Yoshizawa *et al.* 1986, ³Gareis *et al.* 2006, ⁴nach Thuvander *et al.* 1999

Die Zytotoxizität der Trichothecene wirkt sich vor allem auf besonders teilungsaktive Zellen wie die der Schleimhäute und des Immunsystems aus (Bondy *et al.* 2000). Thuvander *et al.* (1999) untersuchten die Wirkung der Trichothecene T-2, DAS, DON und NIV auf die Proliferation menschlicher Lymphozyten. Typ A Trichothecene hemmten die Lymphozytenproliferation um das 100 bis 200-fache im Vergleich zu DON oder NIV (Tabelle 1). T-2 zeigte mit einem IC₅₀-Wert von 0,0006 µg/ml den stärksten zytotoxischen Effekt. Weiter wurde beobachtet, dass es dosis- und toxinabhängig zu unterschiedlichen Wirkungen auf die Produktion von Immunglobulinen kommen kann. So führten beispielsweise DAS-Konzentrationen von bis zu 0,732 ng/ml (2,0 nM) zu einer gesteigerten Produktion von IgA und IgM, während sich höhere Dosen (10 nM) immunsupprimierend auswirkten. Gleiches wurde für T-2 beobachtet. Bei DON kam es erst ab einer Konzentration von 296 ng/ml (1000 nM) zu einer Reduktion der Antikörperproduktion. Immunstimulierende Wirkungen auf IgG bzw. durch NIV wurden nicht festgestellt (Thuvander *et al.* 1999).

2.3 Bedeutung als Lebensmittelkontaminanten

Beim Menschen führte der Verzehr von verschimmeltem Getreide zum Krankheitsbild der sog. „Alimentären Toxischen Aleukie (ATA)“, an der insbesondere zwischen 1942 und 1947 Tausende Menschen im Gebiet von Orenburg, Sibirien, erkrankten (Joffe 1986). Diese Intoxikation ist gekennzeichnet durch Erbrechen, Leukopenie, Haut- und Schleimhautnekrosen, Durchfälle, Hämorrhagien und Schädigungen des Knochenmarks mit einer Mortalitätsrate von bis zu 60 % (Forgacs *et al.* 1962). Aus den Getreideproben wurde u.a. *Fusarium sporotrichioides* und dessen Metabolit T-2 Toxin isoliert, der hauptsächlich für diese Erkrankung verantwortlich gemacht wurde (Mirocha *et al.* 1973).

Trichothecene gehören auch heute noch zu den am häufigsten in Getreide und Mais vorkommenden Mykotoxinen und spielen daher eine bedeutende Rolle als Kontaminanten von Lebensmitteln auf Getreidebasis. In einer europaweiten Studie zur Exposition der Bevölkerung der EU-Mitgliedsstaaten gegenüber Fusarientoxinen wurde DON in 57 % von über 11000 Getreide- und Maisproben und T-2 in 20 % von 3500 untersuchten Proben nachgewiesen (SCOOP 2003). Aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften hat das *Scientific Committee on Food* (SCF) der Europäischen Union in mehreren Stellungnahmen zur Problematik „Fusarientoxine“ Werte für die tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI) der Trichothecene DON, NIV und T-2/HT-2 festgelegt (SCF 1998-2002), wobei es sich bei den Werten für NIV und T-2/HT-2 um noch vorläufige TDI-Werte, sog. tTDI-Werte, handelt. Ergebnisse der SCOOP-Studie (2003) haben ergeben, dass innerhalb der Gruppe der Fusarientoxine die Typ A Trichothecene als besonders bedenklich einzustufen waren, da der tTDI-Wert für T-2 und HT-2 teilweise deutlich überschritten wurde. Hafer, Mais und Weizen wiesen dabei die höchsten Kontaminationen auf. Besonders exponiert war die Subpopulation „Kinder und Kleinkinder“, bei der Überschreitungen des tTDI-Werts für T-2/HT-2 um mehr als das Fünffache festgestellt wurden (Tabelle 2).

Tabelle 2: TDI-Werte einzelner Mykotoxine und deren Ausschöpfung in unterschiedlichen Verbrauchergruppen (nach SCOOP 2003)

Mykotoxin	(t)TDI [µg/kg Körpergewicht]	Gesamt- bevölkerung	Erwachsene	Kinder
Deoxynivalenol	1	0,8 % - 34 %	14 % - 46 %	11 % - 96 %
Nivalenol	0,7	4,2 % - 11 %	0,8 % - 8,2 %	3,7 % - 23 %
T-2 + HT-2 Toxin	0,06	18 % - 250 %	62 % - 172 %	27 % - 563 %

Daher wurden seitens der EU dringend mehr Daten zum Vorkommen dieser Toxine gefordert, auf deren Grundlage gegebenenfalls die Festlegung eines Grenzwerts für T-2 und HT-2 in Getreide und Getreideerzeugnissen für Juli 2008 vorgesehen war (Verordnung (EG) 1881/2006). In der Zwischenzeit wurde vorgeschlagen, diese Frist um ein weiteres Jahr zu verlängern (BVL 2008). Gegenwärtig existieren für Trichothecene nur Höchstwerte für DON, die in Abhängigkeit von der Lebensmittelart bzw. dessen Verwendung oder technologischen Weiterverarbeitung zwischen 200 und 1750 µg/kg liegen (Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 und 1126/2007).

Zum Vorkommen makrozyklischer Trichothecene in Lebensmitteln gibt es kaum Untersuchungen. Stack *et al.* (1980) entwickelten eine Methode für SG und SH in Getreide, wobei die Nachweisgrenzen über 100 µg/kg lagen und keine Feldproben untersucht wurden. Neuere, sensitivere LC-MS Methoden für Trichothecene umfassten keine Satratoxine und es wurden nur einige wenige Proben gemessen (Gentili *et al.* 2007, Stecher *et al.* 2007).

2.4 Bedeutung als Kontaminanten in Innenräumen

Belastungen der Raumluft in Wohngebäuden und Arbeitsstätten wurden in den letzten Jahren immer häufiger für gesundheitliche Beeinträchtigungen exponierter Personen verantwortlich gemacht. Dabei sollen u.a. Stäube, flüchtige organische Verbindungen (*volatile organic compounds*, VOCs), flüchtige organische Verbindungen mikrobiellen Ursprungs (*microbial VOCs*, MVOCs) und auch Mykotoxine eine Rolle spielen. Darunter haben u.a. die hochgiftigen Metaboliten des Pilzes *Stachybotrys chartarum*, die sogenannten makrozyklischen Trichothecene, eine besondere Bedeutung erlangt, da diese in Zusammenhang mit dem *sick building syndrome* (SBS) gebracht werden. Das SBS ist gekennzeichnet durch diverse unspezifische Krankheitssymptome, die von Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwindel, Übelkeit und Schlafstörungen bis hin zu Lungenblutungen reichen. Diese wurden in Wohn- und Bürogebäuden sowie Schulen beschrieben, in denen gleichzeitig *Stachybotrys* (*S.*) spp. isoliert wurden (Johanning *et al.* 1996, Dearborn *et al.* 1999, Scheel *et al.* 2001). Zusätzlich wurde über das Vorkommen von *Stachybotrys*-Toxinen in schimmeligen Tapeten oder Gipskartonplatten aus Wohnräumen bereits mehrfach berichtet (Johanning *et al.* 1996, Andersson *et al.* 1997, Nielsen *et al.* 1998).

Dennoch gilt ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *S. chartarum* und dem SBS als nicht endgültig gesichert, da die Vielzahl luftgetragener Stoffe wie die VOCs, MVOCs,

Feinstäube etc. ebenso für derartige Erkrankungen verantwortlich sein können (Terr 2001, Kuhn *et al.* 2003). Um eine Risikoabschätzung für eine inhalative Belastung gegenüber Typ D Trichothecenen abgeben zu können, müsste vorerst gezeigt werden, ob diese Toxine überhaupt in die Luft übergehen und in welchen Konzentrationen sie vorkommen können (Sudakin 2003). Mittels ELISA durchgeführte Untersuchungen von Brasel *et al.* (2005) deuteten erstmals auf ein tatsächliches Vorkommen dieser Toxine in der Luft von natürlich kontaminierten Gebäuden hin.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenahme

3.1.1 Lebensmittelproben

Die Probenahme für Weizen-, Roggen- und Haferproben erfolgte nach Verordnung (EG) Nr. 401/2006. Bei allen untersuchten Proben handelte es sich damit um repräsentative Proben, die im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung aus Mühlen und Lagerstätten sowie aus dem Groß- und Einzelhandel in Bayern entnommen wurden (Tabelle 3, Publikationen 1 und 2).

Tabelle 3: Untersuchte Lebensmittelproben

	Mühlen	Zentrallager	Einzelhandel	Summe
Weizen und Weizenprodukte	67	30	33	130
Roggen und Roggenprodukte	45	7	9	61
Hafer und Haferprodukte	33	38	27	98
Repräsentative Proben				289

3.1.2 Baumaterial- und Luftproben

Insgesamt 69 Proben von verschimmelten Materialien aus Innenräumen wurden auf das Vorkommen von *Stachybotrys* spp. untersucht. Nach Möglichkeit wurden mindestens 15 cm² Tapete, Gipskartonplatte oder Wandmaterial/Putz aus dem befallenen Bereich entnommen, ansonsten wurde vorerst nur ein Abstrich angefertigt. Die vorkommenden Schimmelpilze wurden anhand morphologischer Kriterien charakterisiert und ausgewählte Materialproben (n=37) dann mittels LC-MS/MS auf das Vorkommen makrozyklischer Trichothecene untersucht (Publikation 3). In zwei Räumen, in denen ein positiver Nachweis geführt werden konnte, wurden zusätzlich Raumluftmessungen durchgeführt. Dazu wurde die Innenraumluft mithilfe eines Luftprobenahmegerätes (MD-8, Sartorius, Göttingen) durch einen Polycarbonatfilter (0,8 µm Porendurchmesser) gefiltert. Die sich in der Luft befindenden Partikel wurden dabei auf der Filtermembran niedergeschlagen, die dann zur LC-MS/MS Analyse verwendet wurde (Publikation 4).

3.2 Herstellung von Standardsubstanzen makrozyklischer Trichothecene

Da nur wenige makrozyklische Trichothecene im Handel verfügbar sind, wurden verschiedene Standardsubstanzen (Satratoxine F, G und H, Roridin E und L-2 sowie Verrucarin J) in Anlehnung an Jarvis *et al.* (1986) selbst hergestellt. Hierbei wurden 50 g Reis mit 50 ml Wasser in einem Erlenmeyerkolben autoklaviert und mit einer Sporensuspension eines toxinogenen Stammes von *Stachybotrys chartarum* versetzt, welcher von einer schimmelbefallenen Materialprobe (Publikation 3) isoliert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 6 Wochen bei Raumtemperatur wurden die Reiskulturen mit Acetonitril/Wasser (84/16) extrahiert und über MycoSep[®]-Säulen (#226) gereinigt (vgl. Probenaufarbeitung unter 3.3.1). Die Extrakte wurden mittels semipräparativer HPLC unter folgenden Bedingungen fraktioniert:

Mobile Phase A:	Methanol
Mobile Phase B:	Reinstwasser
Säule:	Beckman Ultrasphere (ODS) 150 x 4,6 mm, 5 µ
Säulentemperatur:	30 °C
Flussrate:	1000 µl/min
Injektionsvolumen:	200 µl
Gradient (linear):	0 min 90 % B, 40 min 0 % B, 41 min 90 % B, 45 min 90 % B
Detektion:	LC-MS/MS Produktionen-Scan, Ionisation Elektrospray positiv, MRM-Übergänge siehe Tabelle 4

Tabelle 4: LC-MS/MS Parameter zur Fraktionierung makrozyklischer Trichothecene

Analyt	Mutterion [M+NH ₄] ⁺	angenommene Tochterionen		DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [eV]	CXP [V]	Dwell time [msec]
Satratoxin G	562,3	248,9	231,0	21	3,5	22	19	22	40
Satratoxin H	546,3	245,2	231,0	21	4,5	20	25	22	40
Satratoxin F	560,4	249,0	231,0	30	4,0	20	20	20	40
Roridin E	532,4	249,0	231,0	30	4,0	20	20	20	40
Roridin L-2	548,3	249,0	231,0	30	4,0	20	20	20	40
Verrucarin J	502,4	249,0	231,0	30	4,0	20	20	20	40

Zur Detektion der Substanzen im Produktions-Scan (MRM-Modus) wurden zwei für Trichothecene typische Fragmente mit den Massen m/z 249,1 und 231,1 (Berger *et al.* 1999, Nielsen *et al.* 2003) als Tochterionen für die Analyten angenommen, für die keine Referenzsubstanzen verfügbar waren (SF, RE, RL-2 und VJ); die LC-MS/MS Messung wurde mit Standardparametern durchgeführt (Tabelle 4). Mithilfe eines T-Stücks wurde das Eluat vor Eintritt in das Massenspektrometer aufgetrennt und die Fraktionen zu den entsprechenden Retentionszeiten (Abbildung 3) in Reagenzgläsern aufgefangen. Nach Evaporation des Fließmittels wurden die Substanzen in Acetonitril gelöst und bei -20 °C gelagert. SG und SH wurde mithilfe von Referenzstandards eindeutig identifiziert und quantifiziert¹. Die anderen isolierten makrozyklischen Trichothecene konnten aufgrund nicht verfügbarer Referenzsubstanzen nur qualitativ bestimmt werden. Deren Identität wurde anhand spezifischer Fragmente und durch Vergleich mit entsprechenden Elutionsprofilen bestätigt (Andersen *et al.* 2002, Nielsen *et al.* 2003).

¹ Für die Überlassung der Standardsubstanzen SG und SH danke ich Herrn Prof. Gareis, Max-Rubner-Institut, Kulmbach.

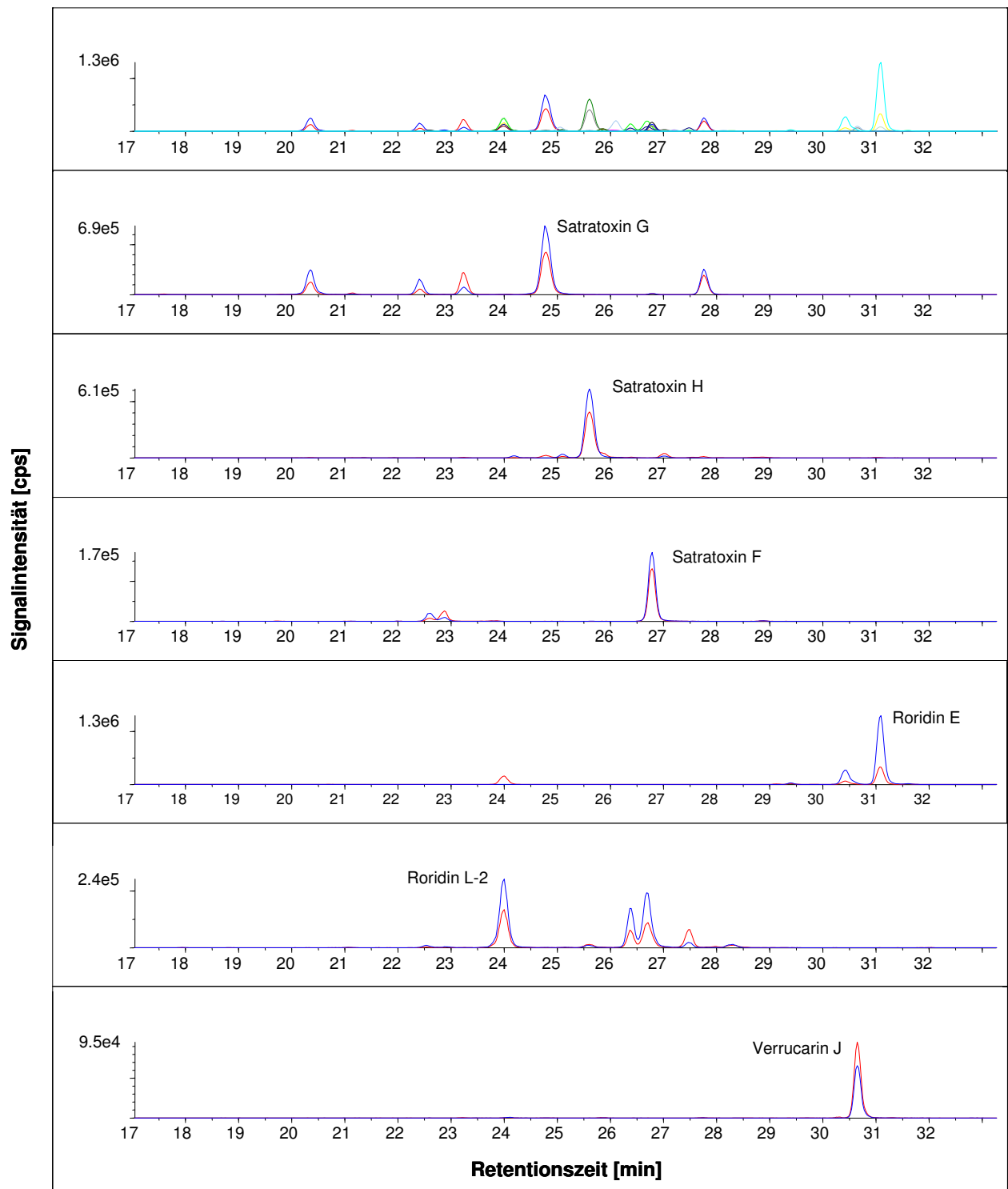


Abbildung 3: MRM-Chromatogramm eines Fraktionierungslaufs (oben) mit extrahierten Ionenspuren der Fragmentationen m/z 249,0 (blau) und 231,0 (rot) einzelner makrozyklischer Trichothecene

3.3 Nachweis von Typ A, B und D Trichothecenen in Cerealien

Zur Bestimmung von 9 Typ A Trichothecenen in Hafer (Publikation 1) sowie von 18 Typ A, B und D Trichothecenen in Weizen, Roggen und Hafer (Publikation 2) wurden zwei Multimethoden entwickelt und validiert. Der Nachweis der Toxine erfolgte durch Tandem-Massenspektrometrie an einem API 4000 Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt). Die HPLC-Anlage (Shimadzu, Duisburg) bestand aus einem Autosampler (Typ SIL HT-C), drei Pumpen (Pumpen A/B: Typ LC-10AD VP, Pumpe C: Typ LC-10AT VP), einem Degasser (Typ DGU-14A) und einem Säulenofen (Typ CTO-10AC VP). Zur direkten Injektion von Standards oder Kalibrationslösungen wurde eine Spritzenpumpe verwendet (11 Plus, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA).

3.3.1 Probenvorbereitung

Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, war nach der entsprechenden Probenahme (Verordnung (EG) Nr. 401/2006) eine aufwendige Homogenisierung des Probenmaterials im Labor notwendig. Einige Sammelproben hatten Gewichte von bis zu 10 kg. Kornproben sowie Flocken und Kleien wurden mit einer Zentrifugalmühle (Retsch ZM 200, Haan) über ein 0,5 mm Ringsieb fein zermahlen. Das Mahlgut sowie bereits als Mehl im Labor eingetroffene Proben wurden nochmals mit einer Mischvorrichtung (Black & Decker KR 650 CRE, Idstein) homogenisiert.

Die Extraktion und Aufreinigung der Proben erfolgte in Anlehnung an die Angaben des Herstellers mittels MycoSep[®]-Säulen (MycoSep[®] #226, Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim). Entsprechend dem in folgender schematischer Darstellung beschriebenen Verfahren (Abbildung 4) war zur Umrechnung des in ng/ml ermittelten Toxingehalts auf den Gehalt in der Probe (µg/kg) der Faktor 1 anzuwenden.

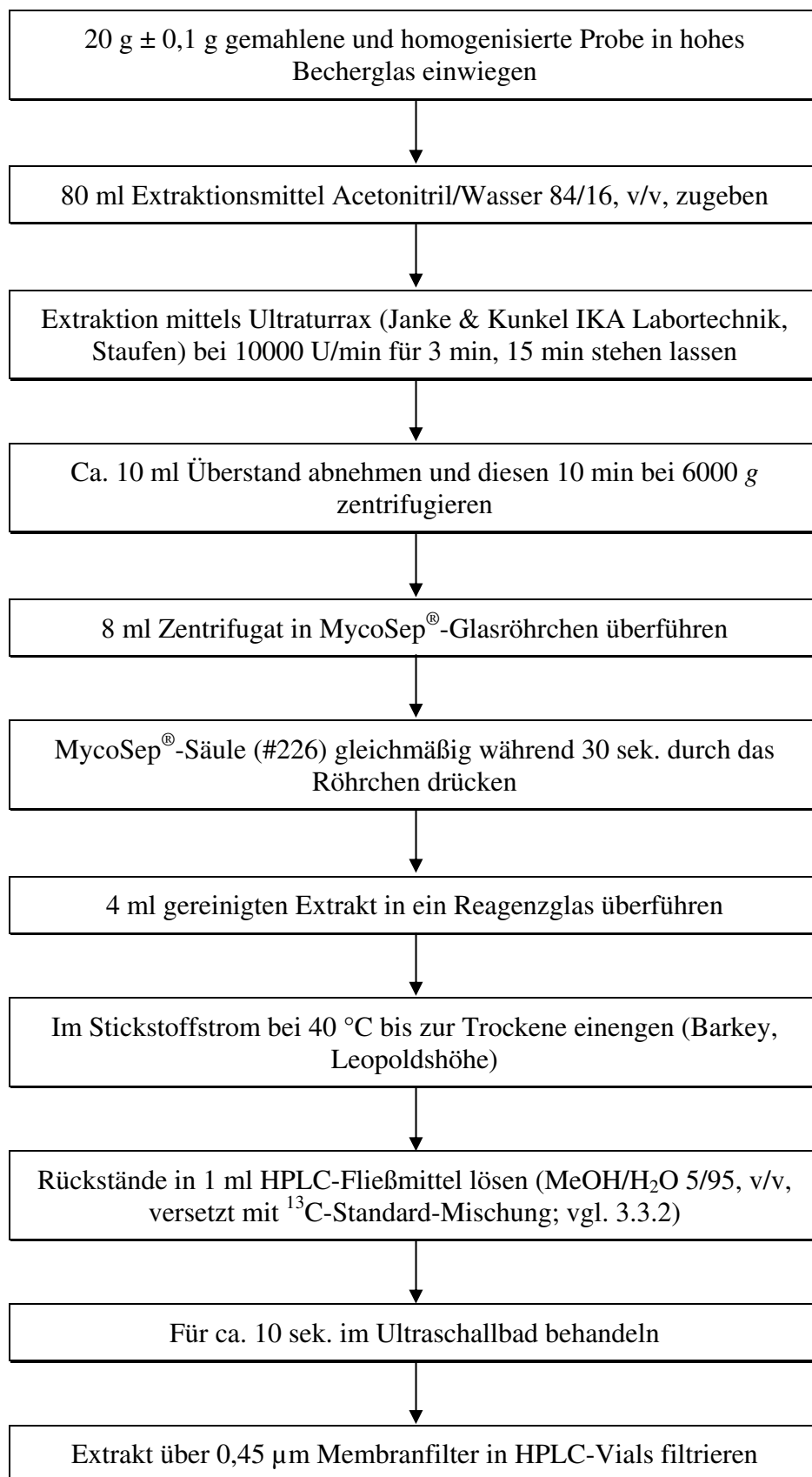


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufarbeitungsmethode für Cerealienproben zum Nachweis von Typ A, B und D Trichothecenen

3.3.2 LC-MS/MS Analytik

In einem ersten Schritt wurde eine Multimethode für Typ A Trichothecene in Hafer entwickelt (Publikation 1), welche danach für den gleichzeitigen Nachweis von 18 Typ A, B und D Trichothecenen in Weizen, Roggen und Hafer erweitert wurde (Publikation 2). Dabei musste T-2 Tetraol jedoch in einer Einzelmethode bestimmt werden, da trotz einer umfangreichen HPLC-Säulenauswahl und mehrfacher Versuche T-2 Tetraol und NIV chromatographisch nicht voneinander getrennt werden konnten. Die beiden Analyten ließen sich jedoch nur in unterschiedlicher Ionisierung ausreichend sensitiv messen, weshalb keine andere Möglichkeit bestand, als diese Toxine in zwei Methoden zu bestimmen. Auf eine explizite Beschreibung der Typ A Methode wird an dieser Stelle verzichtet, da Einzelheiten aus der Publikation 1 hervorgehen und die im Folgenden beschriebene erweiterte Multimethode dieselben Analyten und Parameter umfasst. Die spezifischen Mutter- und Tochterionen (MRM-Übergänge), die zur eindeutigen Identifikation der Substanzen festgelegt wurden, sowie weitere substanzspezifische Daten sind ebenfalls den jeweiligen Publikationen zu entnehmen.

Die Bedingungen der LC-MS/MS-Analyse wurden wie folgt gewählt:

Mobile Phase A:	Methanol + 5 mmol/L Ammoniumformiat
Mobile Phase B:	Reinstwasser
Mobile Phase C:	Methanol (Zugabe über T-Stück nach Trennsäule)
Säule:	Synergi™ Polar-RP® 150 x 2 mm, 4 µ (Phenomenex)
Säulentemperatur:	40 °C
Flussrate:	400 µl/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Ionisierung:	Elektrospray positiv/negativ
MRM-Übergänge:	vgl. Publikation 1 und 2
Identifizierung:	Retentionszeit und spezifische Übergänge eines Mutterions (<i>precursor ion</i>) zu zwei Tochterionen (<i>product ions</i>) gemäß Entscheidung der Kommission 2002/657/EG

Das Gradientenprogramm der Multimethode (Tabelle 5) setzte sich aus einem binären Gradienten (linear) der mobilen Phasen A und B zusammen. Über ein T-Stück wurde während der ersten 11 Minuten nach der chromatographischen Trennung eine optimierte Menge Methanol über die Pumpe C zugegeben, wodurch die Ionisierung von DON stark verbessert und damit die Sensitivität erhöht werden konnte.

Tabelle 5: Gradientenprogramm (linear) der Analysenmethode für Typ A, B und D Trichothecene

Zeit [min]	Pumpe A [% der mobilen Phase]	Pumpe B [% der mobilen Phase]	Flussrate A+B [ml/min]	Flussrate C [ml/min]
0	5	95	0,4	0,8
11,0	5	95	0,4	0,8
11,1	5	95	0,4	0
22,0	65	35	0,4	0
26,0	65	35	0,4	0
27,0	5	95	0,4	0
30,0	5	95	0,4	0

Aus Tabelle 6 geht das Gradientenprogramm der Einzelmethode für den Nachweis von T-2 Tetraol hervor. Dieser Analyt wurde aus denselben Extrakten in einem zweiten Messlauf mit positiver Elektrospray-Ionisierung und leicht abgeänderten Quellenparametern (Publikation 2) bestimmt.

Tabelle 6: Gradientenprogramm (linear) der Analysenmethode für T-2 Tetraol

Zeit [min]	Pumpe A [% der mobilen Phase]	Pumpe B [% der mobilen Phase]	Flussrate A+B [ml/min]
0	30	70	0,4
3,0	30	70	0,4
5,0	70	30	0,4
11,0	70	30	0,4
11,5	30	70	0,4
13,0	30	70	0,4

Im Folgenden ist ein Beispielchromatogramm der Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene dargestellt (Abbildung 5). Der Messlauf wurde in insgesamt fünf Perioden unterteilt, wobei während der ersten Periode negativ und in den folgenden Perioden positiv

ionisiert wurde. Der zugehörigen Tabelle sind zusätzlich die optimierten Quellen- und MS-Parameter wie Temperatur und Gasflüsse zu entnehmen.

Periode	1	2	3	4	5
Ionisierung	ESI -	ESI +	ESI +	ESI +	ESI +
Parameter					
GS1 [psi]	55	55	55	55	55
GS2 [psi]	55	50	55	50	55
ISV [V]	-3000	4500	4500	4500	4500
TEM [°C]	500	500	500	500	500
CUR [psi]	25	20	20	20	20
CAD	9	9	9	9	9

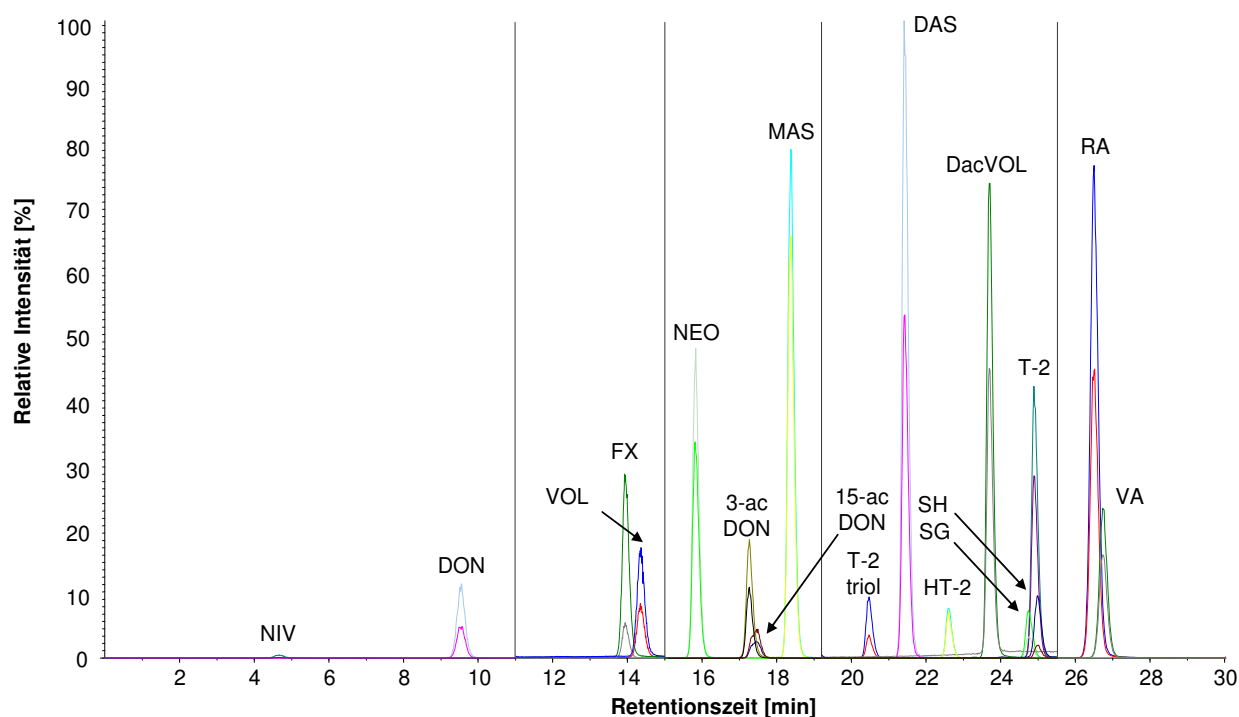


Abbildung 5: Beispielchromatogramm der Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene sowie zugehörige MS-Parameter (MRM-Übergänge siehe Publikation 1 und 2)

Die Quantifizierung erfolgte für die meisten Analyten nach der Methode des externen Standards. Bei der Methodvalidierung für die Matrices Hafer, Weizen und Roggen wurden teilweise jedoch deutliche Matrixsuppressionseffekte beobachtet, die für T-2 und DON mithilfe von ^{13}C -Stabilisotopenstandards korrigiert werden konnten. Dazu wurden die bis zur Trockene eingegangenen Proben am Ende der Probenvorbereitung in Fließmittel aufgenommen, das diese Stabilisotopenstandards in einer Konzentration von je 10 ng/ml enthielt. Für jede Probe wurde

ein Korrekturfaktor gegenüber dem matrixfreien Isotopenstandard berechnet und der DON- und T-2 Toxin-Gehalt mit diesem korrigiert. Zur Kompensation von Matrixeffekten gegenüber T-2 Tetraol und NIV wurde eine Matrixkalibration zur Quantifizierung angewendet. Die zur Erstellung der Kalibrationsgerade eingesetzten Standardverdünnungen wurden dazu nicht in reinem Fließmittel, sondern jeweils mit einem Weizen-, Roggen- oder Haferextrakt hergestellt. Zur Quantifizierung der Toxingehalte der Proben wurden die gemessenen Werte um die mittlere analytische Wiederfindungsrate korrigiert. Werte, die zwischen LOQ und LOD lagen, wurden mit $LOQ/2$ berechnet, wobei dafür die über das Signal/Rausch-Verhältnis ermittelten Werte herangezogen wurden (vgl. Tabelle 13 im Anhang). Statistische Auswertungen wurden mit SigmaStat 3.1 durchgeführt und Grafiken mithilfe SigmaPlot 9.0 erstellt.

3.3.3 Methodenvalidierung

Die entwickelte LC-MS/MS Multimethode wurde als amtliche Analyseverfahren umfassend validiert und durch Teilnahme an Ringversuchen und Laborvergleichsmessungen auf Richtigkeit geprüft. Zur Ermittlung der Verfahrenskenndaten wurden Mischstandards in 25 Konzentrationsstufen zwischen 0,005 und 250 ng/ml zur Prüfung der Linearität hergestellt und die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 durchgeführt. Zur Ermittlung von Variationskoeffizienten und der Varianzhomogenität wurden Standards in den Konzentrationsstufen 1 ng/ml und 10 ng/ml je fünffach gemessen. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD/LOQ) wurden sowohl nach DIN 32645 als auch nach dem Signal/Rausch-Verhältnis (signal-to-noise, S/N) ermittelt.

Die MycoSep[®]-Aufreinigung als Probenvorbereitungsverfahren wurde auf drei Dotierniveaus (50 µg/kg, 10 µg/kg und 1 µg/kg) jeweils im Fünffachansatz für die drei Matrices Hafer, Weizen und Roggen validiert. 20 g Probenmaterial wurde mit Extraktionsmittel versetzt und mit den entsprechenden Mengen Mischstandard artifiziell kontaminiert. Die Proben wurden wie unter 3.3.1 beschrieben aufgereinigt und die Wiederfindungsraten und Standardabweichungen als Kennzahlen für Richtigkeit und Präzision der Methode ermittelt.

3.4 Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen in Baumaterialien und Luftproben

Zum Nachweis von acht makrozyklischen Trichothecenen in Baumaterial- und Raumluftproben wurde eine LC-MS/MS Multimethode entwickelt (Publikation 3 und 4). Die Toxine wurden mithilfe eines API 3200 Massenspektrometers gemessen (Applied Biosystems, Darmstadt). Die HPLC-Anlage, bestehend aus einem Autosampler und zwei Hochdruckgradienten-Pumpen sowie einem Degasser und einem Säulenofen, war vom Typ Series 200 von Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim).

3.4.1 Probenvorbereitung

Von den schimmeligen Materialproben (Tapeten, Putz oder Gipskarton) wurden ca. 15 cm² ausgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt. Die zur Luftfiltration eingesetzten Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 0,8 µm, Filterdurchmesser 80 mm) wurden ebenso in kleine Stücke geteilt. Die Extraktion erfolgte nach Zugabe von 10 ml Acetonitril/Wasser 84/16 während einer Stunde auf dem Horizontalschüttler. Für Materialproben (Publikation 3) wurden die Extrakte 1:5 mit Reinstwasser verdünnt und nach Filtration über einen PTFE-Spritzenfilter (0,45 µm) direkt injiziert (Umrechnungsfaktor von ng/ml auf ng/cm² = 3,33). Aufgrund der teilweise sehr niedrigen Gehalte an makrozyklischen Trichothecenen wurde im Laufe der Untersuchungen ein analog zu der im Folgenden beschriebenen Methode für Luftfilter durchgeführter Aufreinigungsschritt ergänzt (Umrechnungsfaktor 0,11). Die Extrakte (5 ml) der Luftprobenfilter (Publikation 4) wurden über Festphasenkartuschen (BondElut Mycotoxin[®], Varian) gereinigt. 3 ml Filtrat wurden bis zur Trockene evaporiert und in 500 µl Methanol/Wasser 10/90 (v/v) gelöst (Umrechnungsfaktor ng/ml auf ng/Filter = 1,67). Die Toxinmenge je m³ Luft ergab sich aus der Berücksichtigung der insgesamt gefilterten Luftmenge.

3.4.2 LC-MS/MS Analytik

Vor der Entwicklung einer Nachweismethode für Typ D Trichothecene war zunächst die Gewinnung von Standardsubstanzen wie unter 3.2 beschrieben nötig. Die dort angenommenen, für Trichothecene typischen Fragmentationen m/z 249,1 und m/z 231,1, erwiesen sich bei der Durchführung von Produktionen-Scans mit den gewonnenen Standardsubstanzen größtenteils auch als die sensitivsten MRM-Übergänge, weshalb diese für die optimierte Methode gewählt wurden. Die einzelnen Mutterionen und Tochterionen sowie die zugehörigen substanzspezifischen Parameter sind in Tabelle 14 im Anhang aufgeführt. Die Bedingungen der LC-MS/MS-Analyse wurden wie folgt gewählt:

Mobile Phase A:	Methanol + 5 mmol/L Ammoniumformiat
Mobile Phase B:	Reinstwasser + 5 mmol/L Ammoniumformiat
Säule:	Gemini [®] 150 x 2 mm, 5 μ (Phenomenex)
Säulentemperatur:	40 °C
Flussrate:	400 μ l/min
Injektionsvolumen:	20 μ l
Ionisierung:	Elektrospray positiv
MRM-Übergänge:	vgl. Publikation 3 und Tabelle 14 im Anhang
Identifizierung:	Retentionszeit und spezifische Übergänge eines Mutterions (<i>precursor ion</i>) zu zwei Tochterionen (<i>product ions</i>) gemäß Entscheidung der Kommission 2002/657/EG

Das HPLC-Gradientenprogramm (Tabelle 7) setzte sich aus einem binären Gradienten (linear) der mobilen Phasen A und B zusammen.

Tabelle 7: Gradientenprogramm (linear) der Analysenmethode für Typ D Trichothecene

Zeit [min]	Pumpe A [% der mobilen Phase]	Pumpe B [% der mobilen Phase]	Flussrate A+B [ml/min]
0	10	90	0,4
8,0	100	0	0,4
12,0	100	0	0,4
12,5	10	90	0,4
15,0	10	90	0,4

Im Folgenden ist ein Beispielchromatogramm der Nachweismethode für Typ D Trichothecene dargestellt (Abbildung 6). Der zugehörigen Tabelle sind zusätzlich die optimierten Quellen- und MS-Parameter wie Temperatur und Gasflüsse zu entnehmen.

Periode	1
Ionisierung	ESI +
Parameter	
GS1 [psi]	50
GS2 [psi]	30
ISV [V]	4000
TEM [°C]	300
CUR [psi]	20
CAD	7

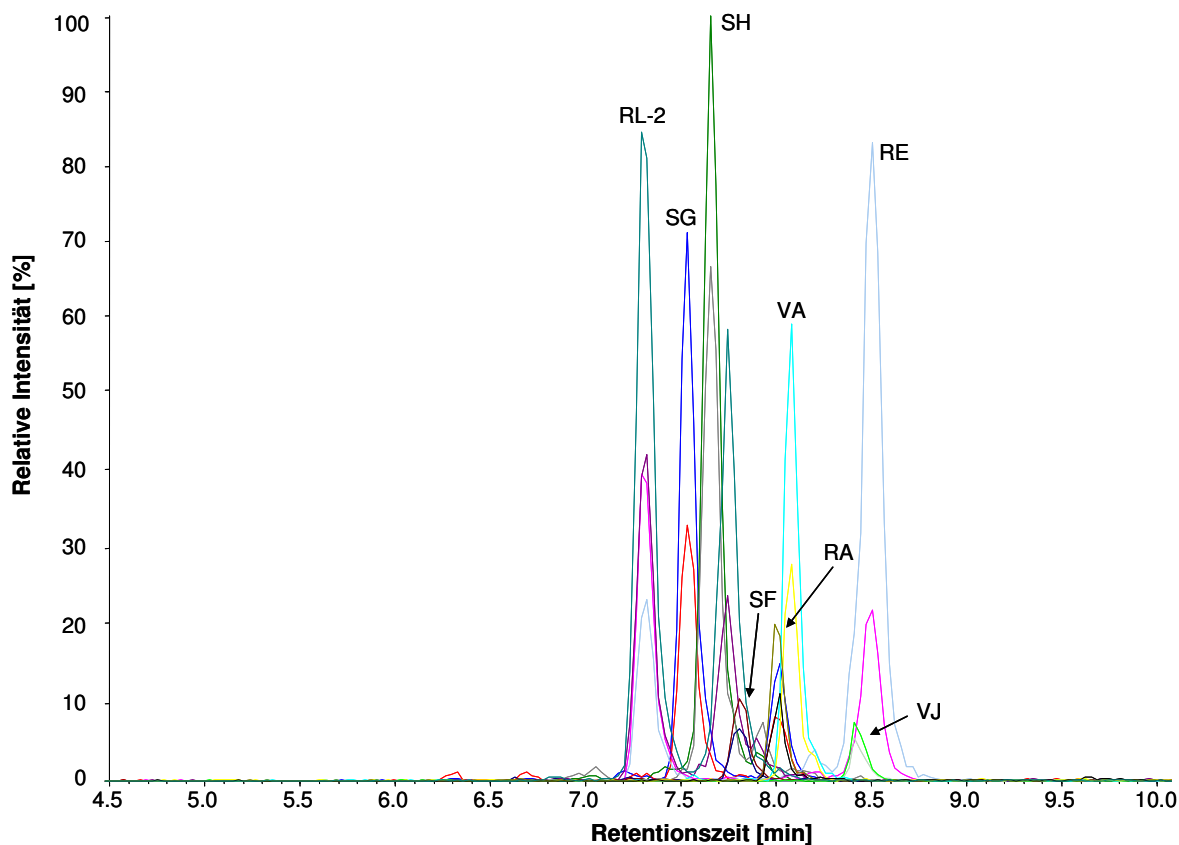


Abbildung 6: Beispielchromatogramm der Multimethode für Typ D Trichothecene mit zugehörigen MS-Parametern (MRM-Übergänge siehe Tabelle 14 im Anhang)

Die Quantifizierung erfolgte für SG, SH, RA und VA nach der Methode des externen Standards. Die Substanzen SF, RE und RL-2 sowie VJ konnten nur qualitativ bestimmt werden, da keine Referenzsubstanzen verfügbar waren.

3.4.3 Methodenvalidierung

Für die entwickelten Methoden zum Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen in schimmelligen Materialien aus Innenräumen sowie in Raumluft wurden Wiederfindungsraten und Standardabweichungen bei Mehrfachbestimmungen der quantitativ erfassten Substanzen ermittelt. Dazu wurden Polycarbonatfilter (n=3) und Tapeten (n=3) artifiziell kontaminiert und entsprechend den beschriebenen Methoden aufgearbeitet.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Validierungsergebnisse

Die Verfahrenskenndaten der Methoden für Typ A, B und D Trichothecene in Cerealien wie Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Variationskoeffizienten sind Tabelle 13 im Anhang zu entnehmen. Der Arbeitsbereich war linear im Bereich zwischen den Nachweisgrenzen (LOD) und 200 bzw. 250 ng/ml. Nach DIN 32645 wurden LODs zwischen 0,1 µg/kg für NEO oder DAS und 1,0 µg/kg für NIV ermittelt. Unter Berücksichtigung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden teilweise noch niedrigere LOD (S/N=3) und LOQ (S/N=9) berechnet. Damit stand für die Untersuchung der aufgelisteten Toxine eine hochempfindliche Bestimmungsmethode mittels LC-MS/MS zur Verfügung.

Die Aufarbeitungsmethode mittels MycoSep[®]-Säulen wurde für die Matrices Hafer, Weizen und Roggen auf drei Dotierniveaus mit je 5 Wiederholungen validiert. Wiederfindungsraten und Standardabweichungen für die drei Matrices sind in Tabellen 15-17 im Anhang aufgeführt. Diese lagen für die meisten Toxine zwischen 71 und 110 % mit relativen Standardabweichungen (RSD) von 0,5 bis 11 % und genügten damit den Anforderungen der EU (Verordnung (EG) 401/2006). Allerdings lagen die Wiederfindungen für NIV vor allem in höheren Konzentrationen bei nur knapp über 50 % bei Weizen sowie im Bereich von 60 % für die anderen Matrices. Ebenso waren die Wiederfindungen für T-2 Tetraol niedriger als die der anderen Toxine, für die Matrix Hafer bei knapp unter 60 %. Dies lässt sich wie auch für NIV auf deren im Vergleich zu den anderen Analyten hohe Polarität zurückführen. Für solche Substanzen sind die verwendeten MycoSep[®]-Säulen weniger gut geeignet. Angesichts der verfügbaren Verfahren für derartige Multimethoden stellten MycoSep[®]-Säulen jedoch den besten Kompromiss dar. Aufgrund ausreichend präziser Messergebnisse wurde die Methode somit für alle Analyten als geeignet betrachtet. Die Richtigkeit der Methode wurde für DON und T-2/HT-2 durch laborinterne und externe Vergleichsmessungen sowie durch Ringversuchsergebnisse bestätigt (Publikation 2).

Validierungsergebnisse der Methoden für *Stachybotrys*-Toxine in Material- und Raumluftproben sind den Publikationen 3 und 4 zu entnehmen. Die Wiederfindungsraten (Mittelwert ± RSD) für SG und SH bei Tapeten lagen bei 93 ± 0,2 % bzw. 107 ± 2,1 % sowie bei 68 ± 3,4 % bzw. 56 ± 4,8 % bei Membranfiltern.

4.2 Trichothecenbelastung von Lebensmittelproben

Die repräsentativ gezogenen Proben zeigten matrixabhängig teils sehr hohe Kontaminationsraten für T-2, HT-2, T-2 Tetraol, MAS und DON (Tabelle 8, Publikation 1 und 2). Daten der SCOOP-Studie zufolge waren nur 21 % der Weizen- und Roggenproben und 16 % der Haferproben mit T-2 belastet (SCOOP 2003) gegenüber hier ermittelten 85 %, 87 % und 100 %, was auf die niedrigen Nachweisgrenzen der neu entwickelten, hochsensitiven LC-MS/MS Methode zurückzuführen war. Gleiches galt für HT-2 und die übrigen Typ A Trichothecene. Aber auch für DON waren deutliche Unterschiede feststellbar. Während in der SCOOP-Studie nur 61 % der Weizenproben, 41 % der Roggenproben und 33 % der Haferproben mit DON belastet waren, lagen die Inzidenzen hier bei jeweils 100 % bei Weizen und Roggen und 74 % bei Hafer. Die entwickelten Multimethoden werden folglich der Forderung der EU nach ausreichend sensitiven Methoden gerecht (Verordnung (EG) 1881/2006), um repräsentative Daten u.a. für T-2/HT-2 liefern zu können, die weniger durch die Nachweisgrenzen der angewandten Methoden beeinflusst wurden (Publikation 1 und 2).

Während nach bisherigen Erkenntnissen bezüglich der Toxingehalte bei Weizen und Roggen vor allem Typ B Trichothecene eine Rolle spielen, treten bei Hafer bekanntermaßen die Typ A Trichothecene in den Vordergrund. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit einer hochsensitiven LC-MS/MS Methode zeigten jedoch, dass auch in Hafer mit geringen Mengen an Typ B und in Weizen und Roggen mit Kontaminationen durch Typ A Trichothecene zu rechnen ist (Tabelle 8). Angesichts des hohen Weizenverzehrs der europäischen Bevölkerung können durchaus auch relevante Mengen an T-2/HT-2 aufgenommen werden (vgl. Risikoeinschätzung unter 4.2.1 und Publikation 2).

Tabelle 8: Kontaminationsraten und Gehalte der wichtigsten Trichothecene in Weizen (n=130), Roggen (n=61) und Hafer (n=98)

Analyt	Getreideart	Inzidenz [%]	Mittlere Belastung [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Maximalwert [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
T-2	Weizen	85	0,21	1,9
	Roggen	87	0,13	0,77
	Hafer	100	4,2	34
HT-2	Weizen	94	1,6	22
	Roggen	93	0,56	2,6
	Hafer	99	10	51
T-2 + HT-2	Weizen	94	1,8	24
	Roggen	95	0,69	3,1
	Hafer	100	15	85
T-2 Triol	Weizen	18	0,08	1,4
	Roggen	5	0,01	0,25
	Hafer	60	0,43	2,7
T-2 Tetraol	Weizen	53	2,6	83
	Roggen	79	2,3	8,1
	Hafer	90	9,7	85
DAS	Weizen	3	0,01	0,25
	Roggen	0	<LOD	<LOD
	Hafer	60	0,05	0,38
MAS	Weizen	92	0,30	5,9
	Roggen	87	0,05	0,31
	Hafer	95	0,09	0,66
NEO	Weizen	24	0,02	0,40
	Roggen	15	0,01	0,10
	Hafer	92	0,37	2,7
DON	Weizen	100	57	1163
	Roggen	100	28	288
	Hafer	74	2,8	55
3-acDON	Weizen	52	0,57	15
	Roggen	59	0,39	5,0
	Hafer	28	0,43	8,2
15-acDON	Weizen	72	0,90	26
	Roggen	80	0,73	8,6
	Hafer	28	0,11	1,4
NIV	Weizen	67	6,8	96
	Roggen	3	0,06	1,8
	Hafer	24	0,96	17
FX	Weizen	5	0,02	0,93
	Roggen	2	0,01	0,18
	Hafer	6	0,02	0,53

Die mittlere T-2/HT-2 Belastung von Weizen betrug allerdings nur 1,8 µg/kg und die Werte lagen im Bereich zwischen LOD und 24 µg/kg. Bei Roggen wurden Werte zwischen LOD und 3,1 µg/kg mit einem Mittelwert von 0,69 µg/kg gemessen. Demgegenüber lag die mittlere Kontamination von Hafer bei 15 µg/kg in einem Wertebereich von 0,04 bis 85 µg/kg (Tabelle 8). In Abbildung 7 sind die Gehalte an T-2/HT-2 in den diversen Matrices und Produktgruppen vergleichend gegenübergestellt. Bezüglich der Kontamination mit Typ A Trichothecenen fielen zusätzlich die Gehalte an T-2 Tetraol auf, die mit denjenigen von T-2 oder HT-2 durchaus vergleichbar waren (Publikation 1 und 2). Nachdem in der SCOOP-Studie (2003) keine Proben auf T-2 Tetraol untersucht wurden, stellen diese repräsentativen Ergebnisse somit wichtige und neue Erkenntnisse für die Erfassung einer Gesamtexposition gegenüber Trichothecenen dar. Auch Klötzel *et al.* (2005) und Schollenberger *et al.* (2006) erhielten in ihren Untersuchungen hohe Werte für T-2 Tetraol. Für die Toxine T-2 Triol, DAS, MAS und NEO wurden vor allem in Hafer höhere Kontaminationsraten zwischen 60 und 95 % ermittelt (Publikation 2). Die Gehalte waren für diese Toxine aber durchwegs niedrig, wobei der höchste Wert für MAS (5,9 µg/kg) in einer Probe Weizenkleie gemessen wurde.

Weizen war im Mittel mit 57 µg/kg DON belastet, die Werte lagen zwischen 0,06 und 1163 µg/kg (Tabelle 8, Publikation 2). Insgesamt wurde nur bei einer Probe (Weizenkleie) eine Höchstwertüberschreitung (Verordnung (EG) 1881/2006) festgestellt. Roggen war im Mittel mit 28 µg/kg in einem Wertebereich von 1,1 bis 288 µg/kg niedriger belastet als Weizen. DON-Werte in Hafer schwankten zwischen LOD und 55 µg/kg, wobei der Mittelwert bei 2,8 µg/kg lag. Die DON-Gehalte unterschiedlicher Matrices und Produktgruppen sind ebenfalls in Abbildung 7 dargestellt. 3- und 15-acDON kamen in etwa 25 % der Haferproben bis hin zu 80 % der Roggenproben vor, sämtliche gemessenen Gehalte waren jedoch mit < 10 µg/kg sehr niedrig. Der höchste Wert für 15-acDON und 3-acDON von 26 bzw. 15 µg/kg sowie auch der höchste NIV-Wert von 96 µg/kg wurde wiederum in der bereits erwähnten Probe Weizenkleie gemessen. 67 % der Weizenproben und 24 % der Haferproben (Höchstwert 17 µg/kg) waren mit NIV kontaminiert. In Roggen spielte dieses Toxin keine Rolle, ebensowenig wie FX, das in weniger als 6 % aller Proben mit weniger als 1 µg/kg nachgewiesen wurde.

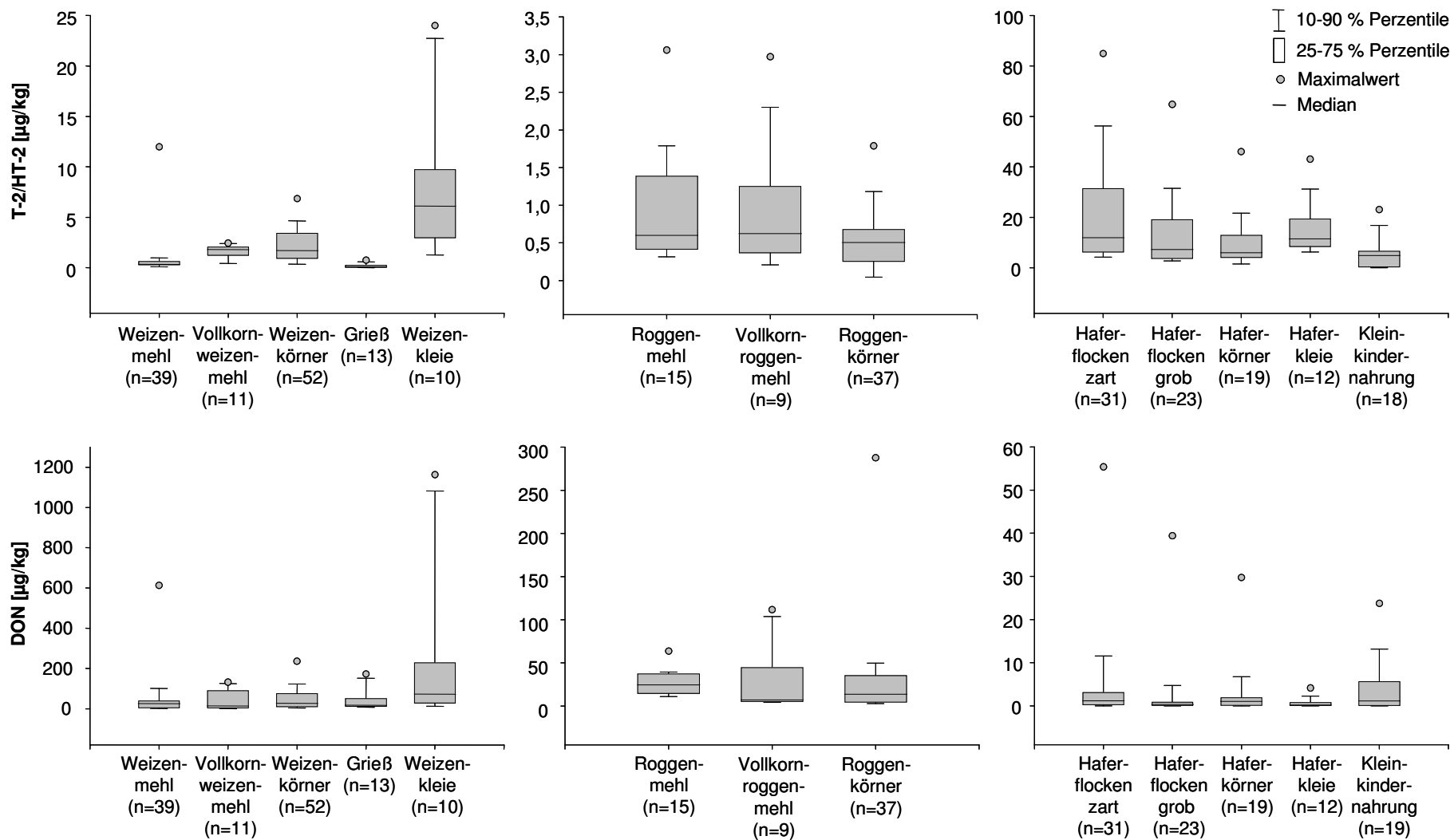


Abbildung 7: Vergleich von T-2/HT-2 Gehalten (oben) und DON-Gehalten (unten) in unterschiedlichen Produktgruppen

Insgesamt war festzustellen, dass die gemessenen Toxinkonzentrationen deutlich unter den Werten der SCOOP-Studie (2003) lagen. Ein Grund dafür kann darin gesehen werden, dass es sich bei den hier untersuchten Proben ausschließlich um Lebensmittel zum direkten Verzehr bzw. zumindest um gereinigtes Getreide handelte. Es ist bekannt, dass der Toxingehalt bei gereinigtem Getreide um bis zu 90 % reduziert ist (Scudamore *et al.* 2007). Aus der SCOOP-Studie geht die Verarbeitungsstufe der gemessenen Proben zwar nicht eindeutig hervor, Werte wie 1150 µg/kg HT-2 oder 5000 µg/kg DON in Hafer und 50000 µg/kg DON in Weizen (SCOOP 2003) legen aber die Vermutung nahe, dass auch Ergebnisse ungereinigter Proben in die Bewertung eingeflossen sein könnten. Durch diese Konzentrationen wurden die Mittelwerte zweifellos deutlich beeinflusst. Diesbezüglich wurden auch die Gehalte weiterer Toxine verglichen und diskutiert (Publikation 2). Des Weiteren kann auch die Herkunft der Proben eine große Rolle spielen. So wurden in der SCOOP-Studie (2003) beispielsweise die Ergebnisse vieler Proben, die auf T-2 und HT-2 untersucht wurden, von nordeuropäischen Ländern beigestrungen, wo üblicherweise besonders hohe Werte auftreten (Langseth *et al.* 1999, Pettersson *et al.* 2006).

Bezüglich einer Mehrfachbelastung der Proben ist jedoch nicht nur das gleichzeitige Vorkommen der Trichothecene DON, T-2 und HT-2 zu berücksichtigen, sondern ebenso die Inzidenz einer großen Anzahl weiterer Analyten. So wurden, wie in Abbildung 8 dargestellt, in allen Proben zwischen einem und elf Analyten gleichzeitig nachgewiesen. Dabei handelte es sich um T-2/HT-2, T-2 Triol, T-2 Tetraol, DAS, MAS, NEO sowie um DON, 3-acDON, 15-acDON, NIV und FX. Dagegen konnte in keiner Probe DacVOL oder VOL (LODs jeweils 0,4 µg/kg) nachgewiesen werden. Außerdem kann bezüglich der makrozyklischen Trichothecene SG, SH, RA und VA festgestellt werden, dass mit einer Kontamination von Lebensmitteln mit diesen hochtoxischen Metaboliten aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse eher nicht zu rechnen ist (LODs zwischen 0,2 und 0,4 µg/kg, Publikation 2).

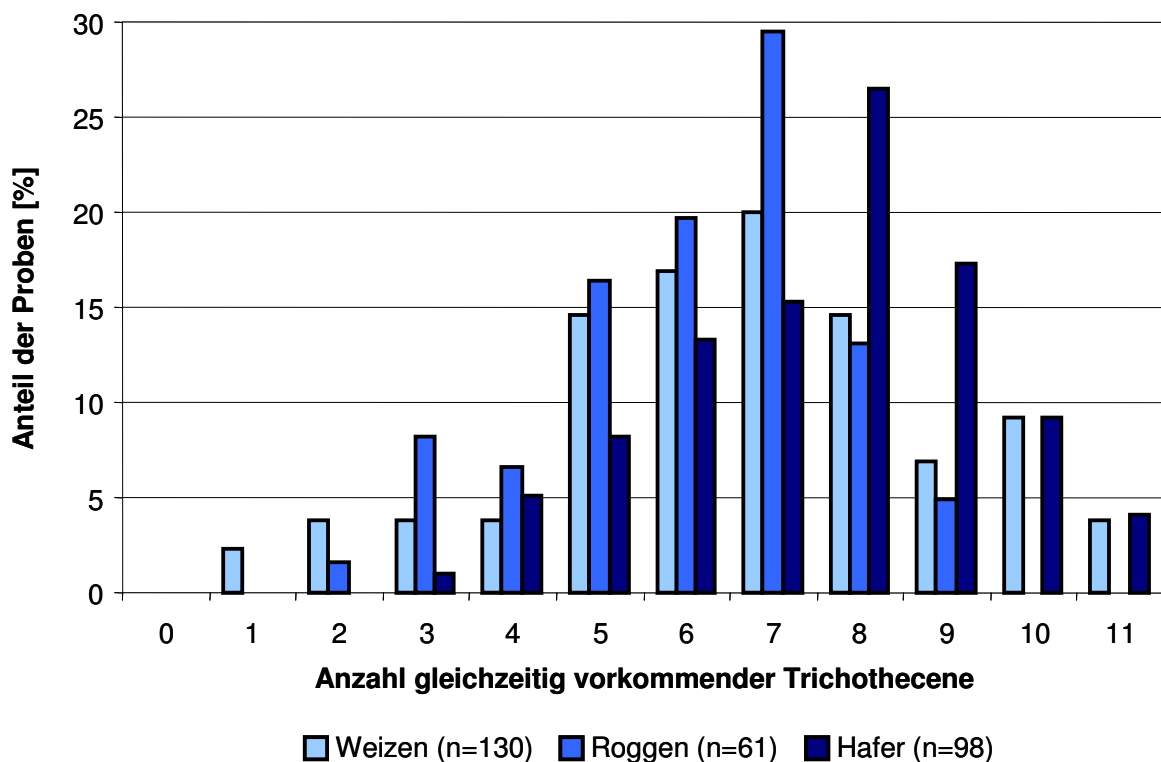


Abbildung 8: Mehrfachbelastung von Weizen-, Roggen- und Haferproben mit Trichothecenen

In Weizen waren 20 % der Proben gleichzeitig mit sieben Trichothecenen belastet, bei Roggen waren es 30 % der Proben, wobei in dieser Matrix maximal neun Analyten gleichzeitig nachgewiesen wurden (Abbildung 8). Hafer zeigte tendenziell eine noch höhere Mehrfachbelastung. Auch von Schollenberger *et al.* (2005) wurde auf das gleichzeitige Vorkommen mehrerer Trichothecene und anderer Mykotoxine hingewiesen, wobei nur in einer von 60 Proben maximal sieben Toxine und in einem Großteil der Proben (85 %) ein bis drei Analyten gefunden wurden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse zur Mehrfachbelastung einzelner Proben den Nutzen umfassender Multimethoden für eine höhere Lebensmittelsicherheit auf.

Seitens des SCF (2002) wurden die Toxine T-2, HT-2, DON und NIV hinsichtlich ihres gemeinsamen Vorkommens in Lebensmitteln bereits gemeinsam evaluiert. Nachdem bis dato keine Anhaltspunkte für mögliche synergistische Effekte vorlagen, die die Bewertung im Rahmen eines Gruppen-TDI notwendig machen würden, wurde auf dessen Festsetzung bis auf Weiteres verzichtet. Eine Gruppenbewertung gestaltet sich aufgrund der unterschiedlichen Toxizitäten der Trichothecene ohnehin sehr schwierig (Kaschube 2008). Dennoch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die gleichzeitig vorkommenden Toxine zu einer insgesamt höheren Gesamtbelastung an Trichothecenen führen.

Zusätzlich konnten durch die Erfassung einer multiplen Belastung auf Einzelprobenniveau deutliche Korrelationen zwischen den Gehalten an T-2 und HT-2 sowie zwischen DON und 15-acDON bestimmt werden, die bei verschiedenen Matrices unterschiedlich ausgeprägt waren. In folgender Grafik ist eine Korrelation zwischen T-2 und HT-2 in Hafer dargestellt (Abbildung 9). Die Gehalte an HT-2 beliefen sich etwa auf das doppelte derer von T-2 ($R^2=0,88$). In Weizen hingegen war der HT-2 Gehalt etwa siebenmal so hoch wie der T-2 Gehalt (Publikation 2). Wie auch der Publikation 2 zu entnehmen ist, beliefen sich die Werte an 15-acDON auf etwa 2 % des DON-Gehalts von Weizen und Roggen; in Hafer waren die Gehalte zu gering, um derartige Zusammenhänge erkennen zu können.

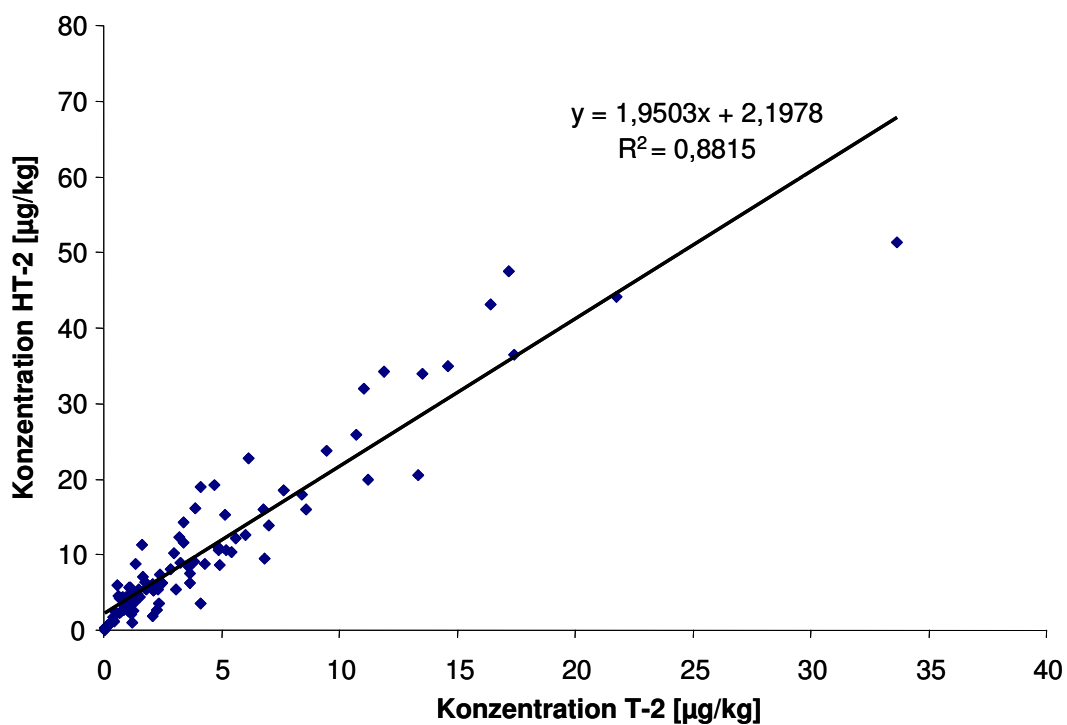


Abbildung 9: Korrelation zwischen T-2 und HT-2 Gehalten in Haferproben (n=98)

Es ist bekannt, dass T-2 durch Deacetylierung an C-4 in Mensch und Tier leicht zu HT-2 metabolisiert werden kann, weshalb die Toxine in der Risikoabschätzung und Höchstmengenregelung auch in der Summe betrachtet werden (SCF 2001). In Pflanzen wurde dieser durch pflanzliche Deacetylasen verursachte Metabolismus zumindest bei *Baccharis* spp. beschrieben (Mirocha *et al.* 1988). Weiter könnten auch bakterielle Deacetylasen für eine vermehrte HT-2 Entstehung verantwortlich sein (Beeton *et al.* 1989, Ueno *et al.* 1983b), wobei es unwahrscheinlich ist, dass dies zu den beobachteten Unterschieden zwischen Weizen und

Hafer und derartig starken Korrelationen führen kann. Vermutlich sind eher die auf verschiedenen Cerealientypen vorkommenden, unterschiedlichen Fusarienspezies für diese Diversitäten im Metabolitenspektrum verantwortlich.

4.2.1 Risikoeinschätzung

Zur Beurteilung der gemessenen Kontaminationen wurde eine Expositionsabschätzung speziell für Kinder, der Bevölkerungsgruppe mit dem höchsten Risiko, durchgeführt, die im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht einen besonders hohen Lebensmittelverzehr haben. Als durchschnittliches Körpergewicht der Subpopulation „2- bis 5-jährige Kinder“ wurden von Banasiak *et al.* (2005) 16,15 kg sowie durchschnittliche tägliche Verzehrsmengen von Hafer, Weizen und Roggen angegeben, die auszugsweise in Tabelle 9 dargestellt sind. Eine Studie von Kersting *et al.* (1998) enthält speziell Daten zum Lebensmittelverzehr von Säuglingen und Kleinkindern bis 12 Monate. Um die Typ A und B Trichothecen-Gehalte der in dieser Arbeit untersuchten Kleinkindernahrungen zu beurteilen, wurden Verzehrdaten für pulverförmige Kleinkindernahrungen 9 Monate alter Kleinkinder (Kersting *et al.* 1998) herangezogen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Täglicher Verzehr bestimmter Getreidesorten/-produkte durch spezielle Verbrauchergruppen

Alter	KG	Verzehrmenge/d			Kleinkinder- nahrung
		Hafer	Weizen	Roggen	
9 Monate	8,95 kg*				30,1 g
2-5 Jahre	16,15 kg**	3,3 g	66,4 g	12,8 g	

*mittleres KG zwischen Mädchen und Jungen (nach Kersting *et al.* 1998); **nach Banasiak *et al.* 2005

Die Trichothecengehalte wurden anhand der lediglich für DON, NIV und T-2/HT-2 existierenden TDI-Werte (Tabelle 2) beurteilt. Für die Berechnung der Toxinaufnahme wurden durchschnittliche Verzehrsmengen mit dem Medianwert sowie dem 95 % Perzentilwert der Toxinbelastung verrechnet, woraus sich prozentuale Ausschöpfungen der TDI-Werte für ein

sogenanntes *mean case* und *bad case* Szenario ergeben. Die entsprechenden Toxingehalte sind in Tabelle 10 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 10: T-2/HT-2, DON und NIV-Gehalte diverser Matrices

	T-2/HT-2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		DON [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		NIV [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	
	Median	95 % Perzentile	Median	95 % Perzentile	Median	95 % Perzentile
Hafer (n=98)	8,2	50	0,53	11	<LOD	6,1
Weizen (n=130)	0,91	6,4	23	162	1,8	24
Roggen (n=61)	0,53	1,8	15	92	<LOD	<LOD
Kleinkindernahrung (n=18)	4,9	18	1,1	16	<LOD	2,5

In folgender Grafik (Abbildung 10) sind die prozentualen Anteile an den TDI-Werten bei durchschnittlichem Weizen-, Roggen- und Haferverzehr einzeln und in der Summe sowie für Kleinkindernahrung für die zwei beschriebenen Szenarien dargestellt.

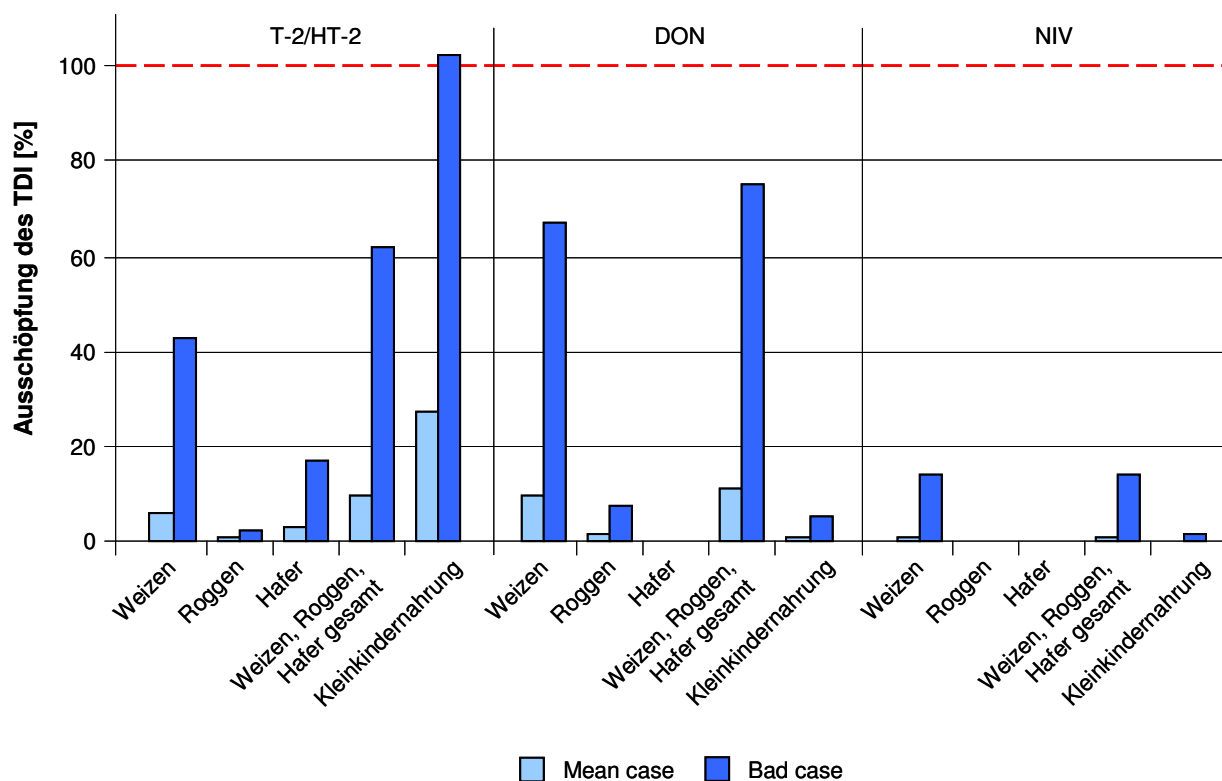


Abbildung 10: Ausschöpfung der TDI-Werte für T-2/HT-2, DON und NIV (Publikation 2)

Im Vergleich zu den Daten des SCOOP-Berichts und einer dort beobachteten mehrfachen Überschreitung des tTDI für T-2/HT-2 (Tabelle 2) kann festgestellt werden, dass von einer deutlich geringeren Belastung der untersuchten Produkte des bayerischen Marktes im untersuchten Zeitraum und damit von einer geringeren Ausschöpfung des tTDI ausgegangen werden kann. Selbst bei Betrachtung des gesamten täglichen Weizen-, Roggen- und Haferverzehrs unter Annahme des 95 % Perzentilwerts der Toxinbelastung kommt es bei der Subpopulation „2- bis 5-jährige Kinder“ zu keiner Überschreitung des tTDI für T-2/HT-2 oder DON. Allerdings waren deutliche Toxinexpositionen von über 60 % bzw. knapp 80 % des jeweiligen TDI zu verzeichnen. In der speziellen Verbrauchergruppe „Kleinkinder“, die schwerpunktmäßig mit Getreidebreien ernährt werden, kann es unter Annahme des *bad case* jedoch tatsächlich zu leichten Überschreitungen des tTDI für T-2/HT-2 kommen (Abbildung 10). Ein Grenzwert wäre daher vor allem für Baby- und Kleinkindernahrung sinnvoll.

Die gleichzeitige Kontamination der Proben mit T-2 Tetraol in Mengen, die die Werte von T-2 und HT-2 teilweise noch übertrafen (Publikation 2), sollte zudem nicht außer Acht gelassen werden, wengleich die Toxizität dieses Metaboliten als geringer eingeschätzt wird (Hanelt *et al.* 1994). In der Summe kommt es jedoch zu einer insgesamt höheren Gesamtbelastung durch die gleichzeitige Exposition gegenüber Typ A und B Trichothecenen, wobei mengenmäßig vor allem der Eintrag über Weizenverzehr von Bedeutung ist. Zur Durchführung einer umfassenderen Risikobewertung wäre daher ein bereits diskutierter Gruppen-TDI für Trichothecene durchaus hilfreich (Pronk *et al.* 2002).

4.2.2 Einfluss der landwirtschaftlichen Erzeugungsweise

Mögliche Unterschiede in der Mykotoxinbelastung von konventionell bzw. ökologisch erzeugten Produkten werden seit Jahren kontrovers diskutiert (Magkos *et al.* 2006). Bezüglich Fusarientoxinen gibt es mehrere Untersuchungen, die eine geringere Belastung von ökologisch erzeugtem Getreide mit DON nachgewiesen haben (Schollenberger *et al.* 1999, 2002, Schneweis *et al.* 2005, Meister 2003, 2005, Döll *et al.* 2002). Andere Autoren beobachteten dagegen keine oder auch gegenteilige Effekte (Jestoi *et al.* 2004, Marx *et al.* 1995, Pussemier *et al.* 2006). Birzele *et al.* (2002) stellten unterschiedliche Einflüsse in Abhängigkeit von den Witterungsbedingungen in zwei aufeinanderfolgenden Jahren fest. Hohe Feuchtigkeit während der Blütezeit von Weizen führte zu höherem DON-Gehalt nach ökologischer Erzeugung

gegenüber konventionell erzeugtem Weizen mit Fungizideinsatz. Im Vergleichsjahr mit geringeren Niederschlägen war Ökoweizen niedriger belastet. Bei derartigen Vergleichen dürfen folglich unterschiedliche Umweltfaktoren wie Temperatur, Feuchte, Bodenbeschaffenheit oder Vorfrüchte nicht außer Acht gelassen werden, um eindeutige Schlüsse ziehen zu können. Schneewis *et al.* (2005) führten einen solchen Versuch unter vergleichbaren Bedingungen durch und kamen zu dem Ergebnis, dass ökologisch erzeugter Weizen tatsächlich geringere Gehalte an DON aufwies.

Alle diese Untersuchungen beschäftigten sich jedoch ausschließlich mit Typ B Trichothecenen, während bisher keine vergleichenden Untersuchungen zu Typ A Trichothecenen bekannt waren. Daher wurden in dieser Arbeit schwerpunktmäßig konventionell (n=35) und biologisch (n=35) erzeugte Haferprodukte untersucht und bezüglich ihres Gehalts an Typ A Trichothecenen verglichen (Publikation 1). Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten erstmalig, dass Bio-Hafer signifikant geringer mit T-2, HT-2, T-2 Tetraol, T-2 Triol und NEO belastet war (Abbildung 11). Die landwirtschaftliche Erzeugungsweise kann daher in Hinblick auf die Fragestellung des Erwägungsgrundes 31 der Verordnung (EG) 1881/2006 als ein Einflussfaktor auf die Toxingehalte der Lebensmittel angesehen werden.

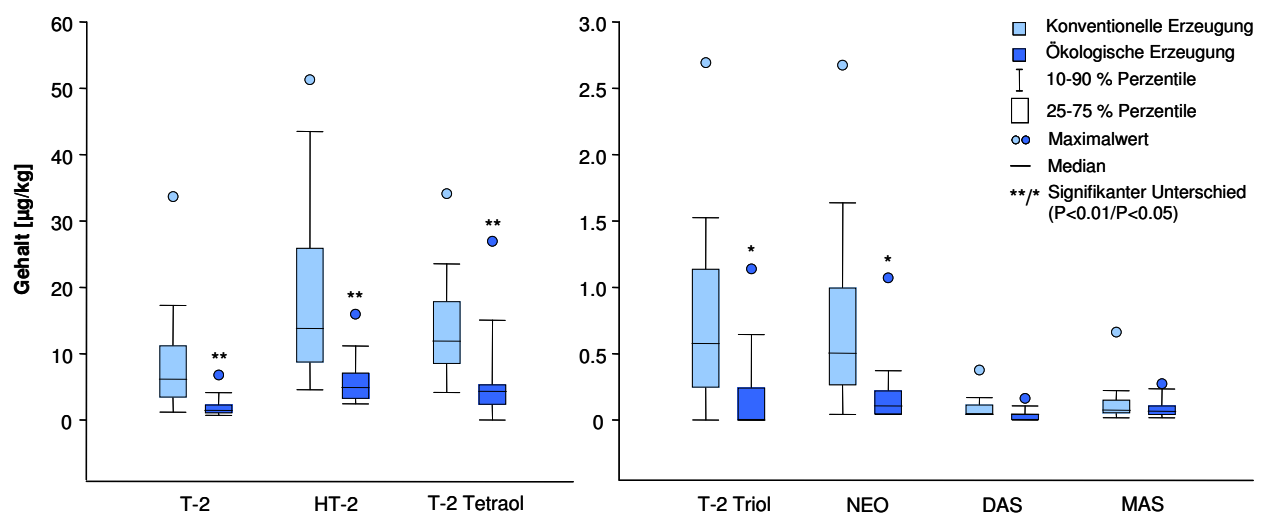


Abbildung 11: Vergleich der Belastung mit Typ A Trichothecenen von konventionell (n=35) und ökologisch (n=35) erzeugtem Hafer (Publikation 1)

Für die am höchsten belasteten und gleichzeitig am meisten verzehrten Haferprodukte, die Haferflocken, wurde zur Interpretation dieser Beobachtungen eine eigene Bewertung für die T-2/HT-2 Exposition durchgeführt (Publikation 1). Während auf der unter 4.2.1 beschriebenen Berechnungsgrundlage beim Verzehr von konventionell erzeugten Haferflocken im *mean case* eine Ausschöpfung des tTDI zu 9,9 % berechnet wurde, lag diese beim Verzehr von Bioprodukten bei nur 2,2 %. Im *bad case* wurden bereits 21 % bzw. nur 5,4 % des tTDI erreicht. Demnach führte die geringere Belastung von Biohafer zu einer um ca. 75 % verringerten Toxinaufnahme.

Generell können eine intensive Bodenbearbeitung, die Einhaltung bestimmter Fruchtfolgen, ein breiterer Saat-Reihenabstand oder andere Sorten im ökologischen Landbau als Gründe für diese Beobachtungen angeführt werden. Zudem soll ein Verzicht auf Fungizide nicht mit höheren Konzentrationen an Mykotoxinen einhergehen (FAO 2000). Gareis *et al.* (1994) und Simpson *et al.* (2001) berichteten sogar von einer Stimulation der Toxinproduktion durch bestimmte Fungizide aus der Gruppe der Strobilurine oder der Triazole. Außerdem wurde diskutiert, dass es durch den Einsatz künstlicher Stickstoff-Düngemittel in der konventionellen Landwirtschaft und dem damit verbundenen schnelleren Wachstum der Pflanze zur Ausbildung dünnerer Zellwände kommt und so eine *Fusarium*-Infektion der Pflanze erleichtert werden kann (Heaton 2001).

4.3 Trichothecenbelastung in Innenräumen

4.3.1 Morphologische Charakterisierung

Durch die morphologische Charakterisierung der auf 69 Proben von Tapeten, Putz oder Gipskarton vorkommenden Schimmelpilze wurden insgesamt 16 verschiedene Spezies identifiziert. Diese sind in folgender Tabelle zusammen mit dem Anteil positiver Proben zusammengefasst (Tabelle 11). Bei *Penicillium*, *Aspergillus* und *Cladosporium* handelte es sich um die am häufigsten nachgewiesenen Schimmelpilze. Aber auch *Stachybotrys* spp. wurden in immerhin knapp 20 % der Proben nachgewiesen. Teilweise wurden bis zu sechs Pilzgattungen gleichzeitig identifiziert (vgl. Tabelle 18 im Anhang).

Tabelle 11: Identifizierte Schimmelpilze auf Proben aus Innenräumen (n=69)

Nachgewiesener Schimmelpilz	Summe positiver Proben	Anteil
<i>Acremonium</i> spp.	2	2,9 %
<i>Alternaria</i> spp.	8	12 %
<i>Aspergillus</i> spp.	25	36 %
<i>Aureobasidium</i> spp.	3	4,3 %
<i>Chaetomium</i> spp.	6	8,7 %
<i>Cladosporium</i> spp.	21	30 %
<i>Cryosporium</i> spp.	1	1,4 %
<i>Gliocladium</i> spp.	2	2,9 %
<i>Memmoniella</i> spp.	1	1,4 %
<i>Monosporium</i> spp.	1	1,4 %
<i>Mucor</i> spp.	8	12 %
<i>Penicillium</i> spp.	41	59 %
<i>Rhizopus</i> spp.	1	1,4 %
<i>Scopulariopsis</i> spp.	2	2,9 %
<i>Stachybotrys</i> spp.	13	19 %
<i>Ulocladium</i> spp.	8	12 %

4.3.2 Nachweis makrozyklischer Trichothecene in Baumaterialien

Insgesamt 37 Proben von Materialien aus Innenräumen wurden mittels LC-MS/MS auf das Vorkommen makrozyklischer Trichothecene untersucht. Ergänzend zu den publizierten Ergebnissen (Publikation 3) wurden im Laufe dieses Projekts noch weitere 22 Proben gesammelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst, wobei die Art der einzelnen

Proben in Tabelle 18 im Anhang näher beschrieben ist. Die Buchstaben a-e der Probennummern bezeichnen dabei unterschiedliche Probenahmestellen von derselben verschimmelten Stelle an einem Probenahmeort. Ein positiver Nachweis nicht quantifizierbarer Substanzen ist durch ein Pluszeichen angezeigt.

Tabelle 12: Vorkommen makrozyklischer Trichothecene in Baumaterialproben (n=37)

Probe Nr.	Nachweis <i>Stachybotrys spp.</i>	SG [ng/cm ²]	SH [ng/cm ²]	SF	RA [ng/cm ²]	RE	RL-2	VA [ng/cm ²]	VJ
3 a	ja	27	20	-	-	-	-	-	-
3 b	ja	740	740	-	-	+	-	-	-
9 a	ja	1560	3260	-	-	+	-	-	-
9 b	ja	9650	12000	+	-	+	+	-	+
10	ja	18	22	-	-	-	-	-	-
11	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
12	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
13	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
16	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
17	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
18	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
21	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
22	ja	-	-	-	-	-	-	-	-
26	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
27	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
30	ja	260	360	+	-	+	+	-	+
31	ja	-	-	-	-	-	-	-	-
47	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
48	nein	700	600	+	-	+	+	-	+
55	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
56	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
57	ja	95	60	+	-	+	+	-	-
58	nein	0,4	-	-	-	-	-	-	-
59	nein	0,6	-	-	-	-	-	-	-
60	ja	-	-	-	-	-	-	-	-
61	ja	-	-	-	-	-	-	-	-
62	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
63	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
64	nein	-	-	-	-	-	-	-	-
65	ja	17	23	+	-	+	+	-	+
66	ja	34	32	+	-	+	+	-	+
67	ja	0,33	0,35	-	-	+	+	-	-
68 a	ja	-	-	-	-	-	-	-	-
68 b	ja	1,8	2,2	-	-	+	+	-	-
68 c	ja	-	-	-	-	-	-	-	-
68 d	ja	1,2	1,1	-	-	+	-	-	-
68 e	ja	1,0	1,9	-	-	+	+	-	-

In 16 Proben (43 %) konnte zumindest SG nachgewiesen werden. Die höchsten Werte für SG lagen bei $9,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, in derselben Probe wurde zudem der Maximalwert an SH ($12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bestimmt (Publikation 3). Wie bereits von Andersen *et al.* (2002) beschrieben, waren auch hier in den Satratoxin-belasteten Proben die Metaboliten RE und RL-2 nachweisbar sowie bei höheren Konzentrationen an SG und SH auch die Analyten SF und VJ. Die von *Myrothecium* spp. gebildeten makrozyklischen Trichothecene RA und VA kamen dagegen in keiner Probe vor.

Frühere Untersuchungen natürlich kontaminierter Proben (Johanning *et al.* 1996, Andersson *et al.* 1997, Nielsen *et al.* 1998, Hodgson *et al.* 1998) umfassten ein geringeres Analytspektrum und lieferten Einzelergebnisse zum SG- oder SH-Gehalt verschimmelter Materialien aus Räumen mit *Stachybotrys*-Befall. Diese lagen zwischen $1,0$ und $17 \mu\text{g}/\text{g}$ analysiertem Material. Tuomi *et al.* (2000) führten erstmals eine LC-MS/MS-Analyse von 79 verschimmelten Materialproben durch, wobei fünf Proben SG und SH mit weniger als $0,8 \mu\text{g}/\text{g}$ enthielten. Zum Vergleich mit den hier erhaltenen Ergebnissen (quantifiziert in ng/cm^2) ist in etwa ein Umrechnungsfaktor von 2,5 anzuwenden (Gewicht einer Tapete von $15 \text{ cm}^2 = 0,4 \text{ g}$). Die Konzentrationen lagen damit zwischen $1,0 \text{ ng}/\text{g}$ SG und $30 \mu\text{g}/\text{g}$ SH (Tabelle 12). Die zuvor beschriebenen Gehalte bewegten sich insgesamt in vergleichbaren Bereichen, auch wenn in vorliegender Untersuchung noch höhere, aber auch deutlich niedrigere Werte bestimmt wurden. Letzteres lässt sich sicherlich auch auf die empfindliche LC-MS/MS Methode zurückführen.

Der Anteil an offensichtlich toxinogenen Stämmen war vergleichsweise hoch, da zumindest in 75 % der *Stachybotrys*-positiven Proben eine Toxinbildung stattfand. Üblicherweise wird jedoch nur ein Drittel der *Stachybotrys chartarum*-Stämme als Produzenten makrozyklischer Trichothecene eingestuft (Andersen *et al.* 2002). Bei den Proben 48, 58 und 59 erfolgte mykologisch kein *Stachybotrys*-Nachweis, obwohl die Proben belastet waren. Der Wasserschaden und das damit verbundene Pilzwachstum in diesem Raum lag allerdings mehrere Jahre zurück, weshalb die Sporen eventuell nicht mehr keimfähig waren. Die Tatsache, dass die Toxine jedoch noch nachgewiesen werden konnten, bestätigt deren hohe Stabilität. Die Untersuchungen verschiedener Proben einer befallenen Stelle (Proben 3, 9 und 68) zeigten, dass die Toxingehalte innerhalb derselben beprobten Fläche sehr stark variieren können.

4.3.3 Nachweis makrozyklischer Trichothecene in Raumluft

Zum Nachweis einer möglichen inhalativen Exposition des Menschen wurde eine Luftmessung in einem Raum durchgeführt, in dem nach einem Wasserschaden hohe Toxinkonzentrationen in verschimmelten Tapeten gemessen wurden (Probe Nr. 9 in Tabelle 12, Publikation 3). Erstmals wurden dabei in der Raumluft SG mit $0,25 \text{ ng/m}^3$ und SH mit $0,43 \text{ ng/m}^3$ mit einem hochsensitiven und spezifischen LC-MS/MS Verfahren nachgewiesen (Publikation 4). Abbildung 12 zeigt ein Chromatogramm der Messung des mit SG und SH kontaminierten Luftfilterextraktes.

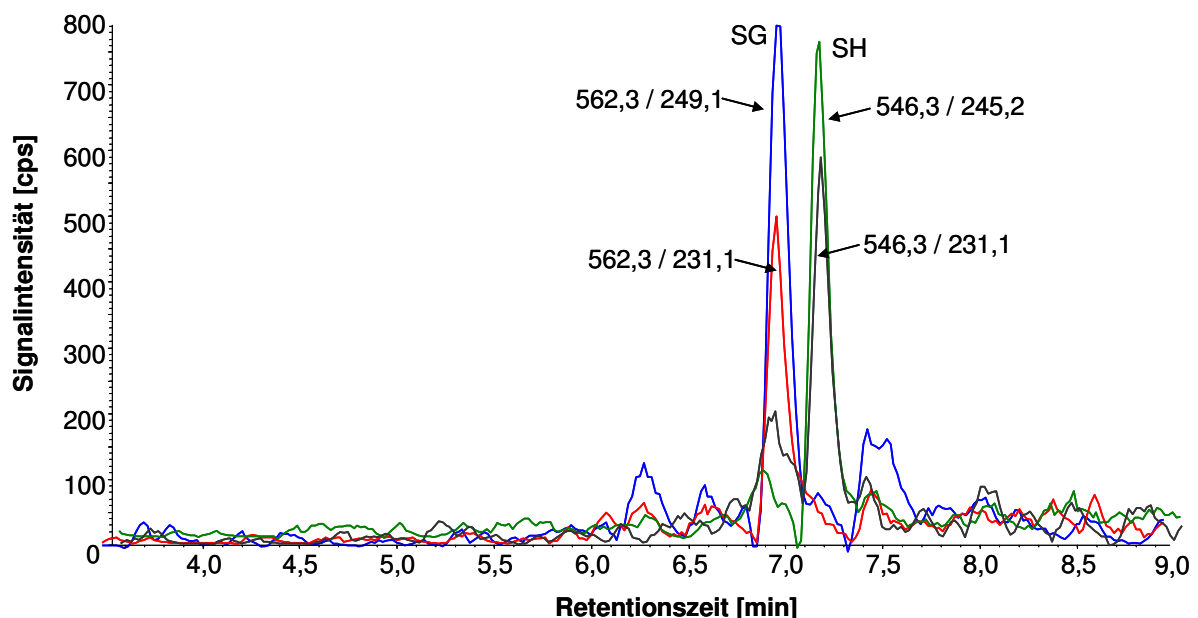


Abbildung 12: MRM-Chromatogramm von SG und SH aus einem Luftfilterextrakt (Publikation 4)

Über einen Zeitraum von 8 h wäre in diesem Raum eine Toxingesamtmenge von $2,0 \text{ ng}$ SG und SH inhaliert worden (unter Annahme eines Atemminutenvolumens von 6 Liter in Ruhe; Betz *et al.* 1997).

In einem zweiten Fall wurde eine Luftprobenahme während der Sanierung eines mit *Stachybotrys* spp. kontaminierten Raumes durchgeführt, aus dem die Proben Nr. 65-68 stammten. Die dort nachgewiesenen Toxingehalte waren zwar vergleichsweise gering (Tabelle 12), jedoch erstreckte sich der Schaden über eine Fläche von ca. 50 Quadratmeter. Die Luft wurde ab Arbeitsbeginn (Abtragen der verschimmelten Gipskartonplatten-Decke) 24 h bei einer Flussrate von $5 \text{ m}^3/\text{h}$ gefiltert. Die Analyse des Filters ergab umgerechnet eine SG-Konzentration

von 0,16 ng sowie eine SH-Konzentration von 0,2 ng je Kubikmeter Luft. Bei Annahme eines Atemminutenvolumens von 100 Litern bei erhöhter körperlicher Anstrengung (Betz *et al.* 1997) errechnet sich während eines Arbeitstages von acht Stunden eine insgesamt inhalede Menge von 7,7 ng SG und 9,6 ng SH. Hierbei ist zu bedenken, dass es durch die lange Probenahme eher zu einer Verdünnung der Gehalte kam und durch erhöhte Staubentwicklung während der Arbeit angenommen werden kann, dass die Toxinbelastung tatsächlich noch höher war.

Zur Auswirkung einer inhalativen Belastung mit Trichothecenen liegen nur wenige Daten vor. Creasia *et al.* (1987) ermittelten in einem Versuch mit Mäusen LD₅₀-Werte von 0,24 mg/kg KG nach einer inhalativen T-2-Exposition. Gegenüber einer oralen Verabreichung (LD₅₀: 10,5 mg/kg, Ueno 1983a) ergibt sich dabei eine etwa 40-fach erhöhte Toxizität. Ebenso wurden bei Ratten und Meerschweinchen erhöhte Toxizitäten durch eine inhalative Aufnahme festgestellt (Creasia *et al.* 1990). Marrs *et al.* (1986) und Pang *et al.* (1988) fanden bei Versuchen mit Meerschweinchen bzw. Schweinen hingegen keine erhöhte Toxizität bei einer inhalativen T-2 Exposition im Vergleich zu einer subkutanen oder intravenösen Verabreichung.

Wie bereits dargelegt, gilt der Zusammenhang zwischen dem SBS und dem Vorhandensein makrozyklischer Trichothecene in Tapeten oder Gipskartonplatten u.a. deswegen als nicht gesichert, da ein tatsächlicher Übergang der Toxine in die Raumluft unter Realbedingungen bisher fraglich war. Die gebildeten Toxine wurden bereits in Lüftungs- und Klimaanlage (Smoragiewicz *et al.* 1993) sowie in Stäuben (Bloom *et al.* 2007) nachgewiesen, was auf die Möglichkeit einer inhalativen Exposition schließen ließ; Brasel *et al.* (2005) berichteten zudem von einem ELISA-Nachweis luftgetragener *Stachybotrys*-Toxine. Hierbei wurden Konzentrationen zwischen 0,01 und 1,3 ng/m³ ermittelt. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen erstmalig mittels eines hochsensitiven und spezifischen LC-MS/MS-Verfahrens, dass makrozyklische Trichothecene von kontaminierten Materialien in die Innenraumluft übergehen und so zu einer direkten inhalativen Belastung des Menschen führen können. Inwiefern diese Mengen für den Menschen toxikologisch bedenklich und für Erkrankungen im Hinblick auf das SBS verantwortlich sein können, muss in weiteren Studien geklärt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Trichothecene sind Mykotoxine, die als Metaboliten von diversen *Fusarium*- und *Stachybotrys*-Spezies sowohl in Lebensmitteln auf Getreidebasis als auch in schimmelbefallenen Innenräumen vorkommen können. Insbesondere bei Typ A Trichothecenen wie T-2 und HT-2 Toxin besteht noch Bedarf an repräsentativen Daten zu deren Vorkommen in Lebensmitteln, auf deren Basis dann gegebenenfalls die Festlegung eines Grenzwertes entsprechend der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 vorgesehen ist. Zusätzlich ist auch die Erfassung einer Mehrfachbelastung mit diesen und anderen Typ A und B Trichothecenen von Interesse. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Frage, inwiefern von den hochtoxischen Typ D Trichothecenen wie den Satratoxinen eine direkte Gesundheitsgefährdung des Menschen ausgehen kann. Einerseits gibt es kaum Untersuchungen mit ausreichend sensitiven und spezifischen Methoden zu deren Vorkommen in Lebensmitteln, andererseits häufen sich Hinweise auf einen Zusammenhang dieser Toxine mit dem *sick building syndrome* (SBS), das eine Vielzahl von Krankheitssymptomen zusammenfasst, die infolge einer Schimmelpilzbelastung von Innenräumen beschrieben wurden.

Die in dieser Arbeit entwickelte LC-MS/MS Multimethode für Lebensmittelproben ermöglichte die Bestimmung von insgesamt 18 Typ A, B und D Trichothecenen. In Abhängigkeit von der Matrix und den Analyten schwankten die mittleren Wiederfindungsraten zwischen 60 und 108 % mit relativen Standardabweichungen (RSD) zwischen 0,5 und 9,9 %. Die nach DIN 32645 ermittelten Nachweisgrenzen (LOD) des Verfahrens lagen zwischen 0,1 µg/kg und 1,0 µg/kg. 94 % der Weizenproben (n=130), 95 % der Roggenproben (n=61) und 100 % der Haferproben (n=98) waren mit T-2/HT-2 belastet. Die mittleren Gehalte lagen bei 1,8 µg/kg, bei 0,69 µg/kg bzw. bei 15 µg/kg. Alle Weizen- und Roggenproben sowie 75 % der Haferproben enthielten im Mittel 57 µg/kg, 28 µg/kg bzw. 2,8 µg/kg DON. Die höchsten T-2/HT-2 bzw. DON-Gehalte wurden in Weizenkleie, Roggenkörnern und Haferflocken gemessen, wobei bei nur einer Probe der EU-Höchstwert für DON überschritten wurde. Neben diesen Analyten kamen noch viele andere Typ A und B Trichothecene in den Proben vor; bis zu elf Analyten wurden gleichzeitig nachgewiesen, was folglich eine höhere Trichothecen-Belastung des Verbrauchers aufzeigt als bisher angenommen. Außerdem wurden zwischen T-2 und HT-2 sowie zwischen DON und 15-Acetyl-DON deutliche Korrelationen beobachtet. Zudem wurde gezeigt, dass ökologisch erzeugte Haferprodukte (n=35) signifikant (P<0,05) geringer mit T-2, HT-2, T-2 Triol, T-2

Tetraol und Neosolaniol belastet waren als konventionell erzeugte Proben (n=35). In keiner der 289 untersuchten Cerealienproben waren Satratoxin G (SG) oder Satratoxin H (SH), Roridin A oder Verrucaridin A über deren LODs nachzuweisen; das Kontaminationsrisiko mit diesen Substanzen ist demnach als eher gering einzustufen.

Die abschließend durchgeführte Expositionsabschätzung hat ergeben, dass unter Annahme der Medianwerte der Toxinbelastung weder für T-2/HT-2 noch für DON und NIV eine Überschreitung der jeweiligen (t)TDI-Werte zu erwarten war, wobei Weizen und Babynahrung die größten Anteile an deren Ausschöpfung hatten. Unter Annahme der 95 % Perzentilwerte der Toxinbelastung wurde der tTDI für T-2/HT-2 durch Weizenverzehr jedoch zu über 40 % ausgeschöpft bzw. bei Babynahrung sogar knapp überschritten. Im Falle von DON spielte nur der Eintrag über Weizen eine bedeutende Rolle (knapp 70 % des TDI). Verglichen mit anderen Abschätzungen im Rahmen der SCOOP-Studie (2003) stellte sich die Exposition und das damit verbundene Risiko des Verbrauchers hier als deutlich geringer dar.

Die LC-MS/MS Methode für schimmelbefallene Baumaterialien und Luftproben erfasste acht makrozyklische Trichothecene. Die Wiederfindungsraten (Mittelwert \pm RSD) für SG und SH für Tapeten lagen bei $93 \pm 0,2$ % bzw. $107 \pm 2,1$ % sowie bei $68 \pm 3,4$ % bzw. $56 \pm 4,8$ % für Membranfilter. Durch die morphologische Charakterisierung der vorkommenden Schimmelpilze wurden *Penicillium*, *Aspergillus* und *Cladosporium* als die dominanten Pilzgattungen identifiziert. In knapp 20 % der Proben wurde ein positiver *Stachybotrys*-Nachweis geführt. Die LC-MS/MS Analysen ergaben, dass Baumaterialien wie Tapeten und Gipskartonplatten (n=37) teilweise hochgradig mit makrozyklischen Trichothecenen kontaminiert waren. Bis zu $9,7 \mu\text{g}$ SG und $12 \mu\text{g}$ SH je cm^2 Baumaterial wurden gleichzeitig mit anderen makrozyklischen Trichothecenen detektiert. Mithilfe von Luftmessungen in zwei trichothecenbelasteten Räumen konnte erstmalig mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden, dass *Stachybotrys*-Toxine von schimmeligen Baumaterialien tatsächlich in die Umgebungsluft übergehen können. Die Konzentration an SG+SH lag bei bis zu $0,7 \text{ ng je m}^3$ Luft. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine direkte, inhalative Exposition des Menschen gegenüber diesen Toxinen möglich ist.

6 SUMMARY

Trichothecenes are mycotoxins which can be produced by various species of *Fusarium* and *Stachybotrys*. Thus, they can be detected in cereal-based food as well as in mouldy indoor environments. For type A trichothecenes like T-2 or HT-2 toxin more data of representative food samples are still required to establish an appropriate maximum level according to Commissions Regulation (EC) No 1881/2006. Furthermore, a multiple burden with these and other type A and B trichothecenes should be assessed. Another part of this work addressed the highly toxic type D trichothecenes and possible health risks to humans. On the one hand, studies on their occurrence in food with sensitive and specific methods are rare. On the other hand, these toxins are suspected of playing a role in the aetiology of the “sick building syndrome” which summarizes a multitude of adverse health effects occurring after exposure to indoor moulds.

In this project, a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 18 type A, B, and D trichothecenes in cereals has been developed. Depending on the cereal types and the analytes, the average recovery rates ranged from 60 to 108 % with RSDs between 0.5 and 9.9 %. The limits of detection (LOD) of this method calculated according to DIN 32645 were between 0.1 and 1.0 µg/kg.

Ninety-four percent of the wheat samples (n=130), 95 % of the rye samples (n=61), and 100 % of the oat samples (n=98) were contaminated with T-2/HT-2. The mean values were 1.8 µg/kg, 0.69 µg/kg, and 15 µg/kg, respectively. All wheat and rye samples, and 75 % of the oat samples were burdened with DON with mean values of 57 µg/kg, 28 µg/kg, and 2.8 µg/kg, respectively. The highest values of T-2/HT-2 and DON were found in wheat bran, rye kernels and oat flakes, while only one sample exceeded the maximum level set by the EC. Besides these analytes, many other type A and B trichothecenes occurred in the samples; up to eleven analytes were detected simultaneously, leading to a higher trichothecene burden of the consumer than previously assumed. Furthermore, strong correlations between T-2 and HT-2 as well as DON and 15-acetyl-DON were observed. Moreover, organically produced oats (n=35) were significantly lower ($P < 0.05$) contaminated with T-2, HT-2, T-2 triol, T-2 tetraol, and neosolaniol than conventionally produced samples (n=35). Finally, none of the 289 cereal samples analysed contained satratoxin G (SG), satratoxin H (SH), roridin A or verrucarin A above their LODs; thus, the risk of contamination with the analytes could be regarded as rather low.

The results of the risk assessment have shown that neither the (t)TDI-values for T-2/HT-2, DON nor for NIV were exceeded when assuming median toxin levels. However, wheat and baby food most contributed to the trichothecene intake. Assuming the 95th percentile values of the toxin contamination, 40 % of the tTDI for T-2/HT-2 was reached by wheat consumption and it was even slightly exceeded as calculated for infant food. For DON, only the intake by wheat ingestion played a major role (nearly 70 % of the TDI). Compared to former assessments as conducted by SCOOP (2003), the exposition and the risk of the consumer was considerably lower in this study.

The LC-MS/MS method for mouldy indoor materials and air comprised eight macrocyclic trichothecenes. The recovery rates (mean \pm RSD) for SG and SH from wallpapers were 93 ± 0.2 % and 107 ± 2.1 %, respectively, and 68 ± 3.4 % and 56 ± 4.8 % from air filter membranes, respectively. The morphological characterization of the fungi revealed *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Cladosporium* as the predominant genera. Nearly 20 % of the samples contained *Stachybotrys* spp. It was shown by LC-MS/MS that mouldy indoor materials like wallpapers or gypsum boards (n=37) partly were highly contaminated with macrocyclic trichothecenes. Up to 9.7 μg SG and 12 μg SH per cm^2 mouldy material have been detected together with other type D trichothecenes. The measurement of air samples from two trichothecene-contaminated rooms first revealed by LC-MS/MS that *Stachybotrys*-toxins actually can be transferred from mouldy materials into air. The concentration of SG+SH was 0.7 ng/m^3 sampled air. These results indicate that a direct inhalative exposition of humans to these toxins is possible. Whether these concentrations are high enough to cause adverse health effects must be concluded after further study.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSEN B, NIELSEN KF, JARVIS BB. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia*. 2002;94:392-403.

ANDERSSON MA, NIKULIN M, KÖLJALG U, ANDERSSON MC, RAINEY F, REIJULA K, HINTIKKA E-L, SALKINOJA-SALONEN M. Bacteria, Molds, and Toxins in Water-Damaged Building Materials. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63:387-393.

BABICH H, BORENFREUND E. Cytotoxicity of T-2 Toxin and its Metabolites Determined with the Neutral Red Cell Viability Assay. *Appl Environ Microbiol*. 1991;51:2101-2103.

BANASIAK U, HESEKER H, SIEKE C, SOMMERFELD C, VOHMANN C. Abschätzung der Aufnahme von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in der Nahrung mit neuen Verzehrsmengen für Kinder. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz*. 2005;48:84-98.

BEETON S, BULL AT. Biotransformation and Detoxification of T-2 Toxin by Soil and Freshwater Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55:190-197.

BENNETT JW, KLICH M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:497-516.

BERGER U, OEHME M, KUHN F. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 1999;47:4240-4245.

BETZ E, REUTTER K, MECKE D, RITTER H. *Biologie des Menschen*. Quelle & Meyer Verlag, Wiesbaden. 1997.

BIRZELE B, MEIER A, HINDORF H, KRÄMER J, DEHNE H-W. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *Eur J Plant Pathol*. 2002;108:667-673.

BLOOM E, BAL K, NYMAN E, MUST A, LARSSON L. Mass Spectrometry-Based Strategy for Direct Detection and Quantification of Some Mycotoxins Produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in Indoor Environments. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:4211-4217.

BONDY GS, PESTKA JJ. Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ Health B.* 2000;3:109-143.

BOTTALICO A, PERRONE G. Toxinogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol.* 2002;108:611-624.

BRASEL TL, MARTIN JM, CARRIKER CG, WILSON SC, STRAUS DC. Detection of Airborne *Stachybotrys chartarum* Macrocytic Trichothecene Mycotoxins in the Indoor Environment. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:7376-7388.

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL).
Ergebnisvermerk des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz vom 22.07.2008 zur Sitzung des Sachverständigenausschusses „Agrarkontaminanten“ am 07.07.2008 in Brüssel, TOP 1c. Fachinformationssystem Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (FIS-VL).

COLE RJ, JARVIS BB, SCHWEIKERT MA. Handbook of Secondary Fungal Metabolites. Volume III. Academic Press, London. 2003.

CREASIA DA, THURMAN JD, JONES LJ III, NEALLEY ML, YORK CG, WANNEMACHER RW JR., BUNNER DL. Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in mice. *Fundam Appl Toxicol.* 1987;8:230-235.

CREASIA DA, THURMAN JD, WANNEMACHER RW JR., BUNNER DL. Acute Inhalation Toxicity of T-2 Mycotoxin in the Rat and Guinea Pig. *Fundam Appl Toxicol.* 1990;14:54-59.

DEARBORN DG, YIKE I, SORENSON WG, MILLER MJ, ETZEL RA. Overview of investigation into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. *Environ Health Persp.* 1999;107:495-499.

DIN 32645 „Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung“. Deutsches Institut für Normung, Berlin. 1994.

DÖLL S, VALENTA H, DÄNICKE S, FLACHOWSKY G. *Fusarium* mycotoxins in conventionally and organically grown grain from Thuringia/Germany. *Landbauforsch Volk*. 2002;52:91-96.

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION 2002/657/EG zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. *Amtsblatt der Europäischen Union*. 2002;L 221:8-36.

EPPLEY RM, BAILEY WJ. 12,13-epoxy-delta9-trichothecenes as the probable mycotoxins responsible for Stachybotryotoxicosis. *Science*. 1973;181:758-760.

FEINBERG B, MCLAUGHLIN CS. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley VR. *Trichothecene mycotoxicosis. Pathophysiologic effects*. Band 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1989:27-35.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food safety and quality as affected by organic farming. Twenty second FAO regional conference for Europe. Porto, Portugal, 2000.

FORGACS J, CARLL WT. Mycotoxicosis. *Adv Vet Sci*. 1962;7:273-382.

GAREIS M, CEYNOWA J. Effect of the fungicide matador (tebuconazole/tridimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1994;198:244-248.

GAREIS M. Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. *J Verbr Lebensm*. 2006;1:354-363.

GENTILI A, CARETTI F, D'ASCENZO G, MAINERO ROCCA L, MARCHESE S, MATERAZZI S, PERRET D. Simultaneous Determination of Trichothecenes A, B, and D in Maize Food Products by LC-MS-MS. *Chromatographia*. 2007;66:669-676.

HANELT M, GAREIS M, KOLLARCZIK B. Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia*. 1994;128:167-174.

HEATON S. *Organic Farming, Food Quality and Human Health*. Soil Association. Bristol, England, 2001.

HERNÁNDEZ F, CANNON M. Inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the 12,13-epoxytrichothecenes Trichodermol, Diacetoxyscirpenol and Verrucaric acid. *J Antibiotics*. 1982;35:875-881.

HODGSON MJ, MOREY P, LEUNG W-Y, MORROW L, MILLER D, JARVIS BB, ROBBINS H, HALSEY JF, STOREY E. Building-Associated Pulmonary Disease From Exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *J Occup Environ Med*. 1998;40:241-249.

JARVIS BB, EPPLEY RM, MAZZOLA EP. Chemistry and bioproduction of macrocyclic trichothecenes. In: Ueno Y. *Trichothecenes – Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Elsevier, Amsterdam. 1983:20-38.

JARVIS BB, LEE Y-W, COMEZOGU SN, YATAWARA CS. Trichothecenes produced by *Stachybotrys atra* from Eastern Europe. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51:915-918.

JARVIS BB, SORENSON WG, HINTIKKA EL, NIKULIN M, ZHOU Y, JIANG J, WANG S, HINKLEY S, ETZEL RA, DEARBORN D. Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:3620-3625.

JECFA. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) - WHO Food Additives series 47 – FAO Food and Nutrition Paper – IPCS – International Programme on Chemical Safety, World Health Organisation, Geneva. 2001.

JESTOI M, SOMMA MC., KOUVA M, VEIJALAINEN P, RIZZO A, RITIENI A, PELTONEN K. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. *Mol Nutr Food Res*. 2004;48:299-307.

JOFFE AZ. *Fusarium species: Their biology and toxicology*. John Wiley & sons, New York, USA. 1986.

JOHANNING E, BIAGINI R, HULL D, MOREY P, JARVIS B, LANDSBERGIS P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health*. 1996;68:207-218.

KASCHUBE M. Persönliche Mitteilung. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen. 2008.

KERSTING M, ALEXU U, SICHERT-HELLERT W, MANZ F, SCHÖCH G. Measured consumption of commercial infant food products in German infants: results from the DONALD study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998;27:547-552.

KLÖTZEL M, GUTSCHE B, LAUBER U, HUMPF HU. Determination of 12 Type A and B Trichothecenes in Cereals by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2005;53:8904-8910.

KRSKA R, BAUMGARTNER S, JOSEPHS R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem*. 2001;371:285-299.

KUHN DM, GHANNOUM MA. Indoor Mold, Toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: Infectious Disease Perspective. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:144-172.

LANGSETH W, RUNDBERGET T. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*. 1999;147:157-165.

MAGKOS F, ARVANITI F, ZAMPELAS A. Organic Food: Buying More Safety or Just Peace of Mind? A Critical Review of the Literature. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46:23-56.

MARRS TC, EDGINTON JA, PRINCE PN, UPSHALL DG. Acute toxicity of T2 mycotoxin to the guinea-pig by inhalation and subcutaneous routes. *Br J Exp Pathol.* 1986;67:259-268.

MARX H, GEDEK B, KOLLARCZIK B. Vergleichende Untersuchungen zum mykotoxikologischen Status von ökologisch und konventionell angebautem Getreide. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1995;201:83-86.

MCLAUGHLIN CS, VAUGHAN MH, CAMPBELL IM, WEI CM, STAFFORD ME, HANSEN BS. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. In: Rodricks CW, Hesseltine CW, Mehlman MA. *Mycotoxins in human and animal health.* Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois, USA. 1977:261-284.

MEISTER U. *Fusarium* toxins in bread cereals of the land Brandenburg – comparison of integrated/ecological cultivation of 2000 to 2002. *Mycotoxin Research.* 2003;19:157-161.

MEISTER U. *Fusarium* toxins in bread cereals of the land Brandenburg in the years 2000 to 2004 – comparison of integrated and ecological cultivation. *Mycotoxin Research.* 2005;21:231-236.

MIROCHA CJ, ABBAS HK, TREEFUL L, BEAN G. T-2 Toxin and Diacetoxyscirpenol Metabolism by *Baccharis* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54:2277-2280.

MIROCHA CJ, PATHRE S. Identification of the toxic principle in a sample of Poaeufusarin. *Appl Microbiol.* 1973;26:719-724.

NIELSEN KF, HANSEN MO, LARSEN TO, THRANE U. Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1998;42:1-7.

NIELSEN KF, SMEDSGAARD J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A.* 2003;1002:111-136.

PANG VF, LAMBERT RJ, FELSBURG PJ, BEASLEY VR, BUCK WB, HASCHEK WM. Experimental T-2 toxicosis in swine following inhalation exposure: clinical signs and effects on hematology, serum biochemistry, and immune response. *Fundam Appl Toxicol.* 1988;11:100-109.

PETTERSSON H, BÖRJESSON T. T-2 and HT-2 Toxins in Oats. Conference Transcript 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, Polen. 29.-31. Mai 2006.

PRONK MEJ, SCHOTHORST RC, EGMOND HP VAN. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes (Report Nr. 388802024/2002). National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Niederlande. 2002.

PUSSEMIER L, PIÉRARD J-Y, ANSELME M, TANGNI EK, MOTTE J-C, LARONDELLE Y. Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. *Food Add Contam.* 2006;23:1208-1218.

ROCHA O, ANSARI K, DOOHAN FM. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Add Contam.* 2005;22:369-378.

SHEEL CM, ROSING WC, FARONE AL. Possible sources of sick building syndrome in a Tennessee middle school. *Arch Environ Health.* 2001;56:413-417.

SCHNEWEIS I, MEYER K, RITZMANN M, HOFFMANN P, DEMPFLER L, BAUER J. Influence of organically or conventionally produced wheat on health, performance and mycotoxin residues in tissues and bile of growing pigs. *Arch Anim Nutr.* 2005;59:155-163.

SCHOLLENBERGER M, JARA HT, SUCHY S, DROCHNER W, MÜLLER H-M. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. *Int J Food Microbiol.* 2002;72:85-89.

SCHOLLENBERGER M, MÜLLER H-M, RÜFLE M, SUCHY S, PLANK S, DROCHNER W. Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *Int J Food Microbiol.* 2005;97:317-326.

SCHOLLENBERGER M, MÜLLER H-M, RÜFLE M, SUCHY S, PLANK S, DROCHNER W. Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia*. 2006;161:43-52.

SCHOLLENBERGER M, SUCHY S, JARA HT, DROCHNER W, MÜLLER H-M. A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*. 1999;147:49-57.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF). Opinions of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* Toxins, Part 1-6. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection. 1998-2002. http://www.europa.eu.int/food/fs/sc/scf/qutcome_en.html#opinions.

SCIENTIFIC COOPERATION (SCOOP). SCOOP Task 3.2.10: Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by population of EU Member States. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection. 2003. <http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>

SCUDAMORE KA, BAILLIE H, PATEL S, EDWARDS SG. Occurrence and fate of *Fusarium* mycotoxins during commercial processing of oats in the UK. *Food Add Contam*. 2007;24:1374-1385.

SIMPSON DR, WESTON GE, TURNER JA, JENNINGS P, NICHOLSON P. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *Eur J Plant Pathol*. 2001;107:421-431.

SMORAGIEWICZ W, COSSETTE B, BOUTARD A, KRZYSTYNIAK K. Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings. *Int Arch Occup Environ Health*. 1993;65:113-117.

STACK ME, EPPLEY RM. High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Satratoxins G and H in Cereal Grains. *J Assoc Off Anal Chem*. 1980;63:1278-1281.

STECHER G, JARUKAMJORN K, ZABORSKI P, BAKRY R, HUCK CW, BONN GK. Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. *Talanta*. 2007;73:251-257.

SUDAKIN, DL. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*. 2003;143:97-107.

TERR AI. *Stachybotrys*: relevance to human disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87:57-63.

THRANE U, ADLER A, CLASEN P-E, GALVANO F, LANGSETH W, LEW H, LOGRIECO A, NIELSEN KF, RITIENI A. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int J Food Microbiol*. 2004;95:257-266.

THUVANDER A, WIKMAN C, GADHASSON I. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. *Food Chem Toxicol*. 1999;37:639-648.

TORP M, NIRENBERG HI. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *Int J Food Microbiol*. 2004;95:247-256.

TUOMI T, REIJULA K, JOHANSSON T, HEMMINKI K, HINTIKKA E-L, LINDROOS O, KALSO S, KOUKILA-KÄHKÖLA P, MUSSALO-RAUHAMAA H, HAAHTELA T. Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1899-1904.

UENO Y. Trichothecenes – Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Elsevier, Amsterdam. 1983a.

UENO Y, NAKAYAMA K, ISHII K, TASHIRO F, MINODA Y, OMORI T, KOMAGATA K. Metabolism of T-2 Toxin in *Curtobacterium* sp. Strain 114-2. *Appl Environ Microbiol*. 1983b;46:120-127.

VERORDNUNG (EG) 401/2006 DER KOMMISSION (23. Februar 2006) zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln. Amtsblatt der Europäischen Union 2006;L 70:12-34.

VERORDNUNG (EG) 1881/2006 DER KOMMISSION (19. Dezember 2006) zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. Amtsblatt der Europäischen Union. 2006;L 364:5-24.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Selected mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. Environmental health criteria 105, Geneva, Switzerland. 1990.

YOSHIZAWA T, OTSUBO K, SASAKI T, NAKAMURA K. Acute toxicities of satratoxins G and H in mice. A histopathological observation with special reference to the liver injury caused by satratoxin G. Maikotokishin (Tokyo). 1986;23:53-57. Zitiert nach Jarvis BB. Macrocyclic Trichothecenes. In: Sharma RP, Salunkhe DK. Mycotoxins and Phytoalexins. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1991:361-421.

8 EIGENE PUBLIKATIONEN

[1] Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51:1547-1553.

[2] Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Add Contam.* 2009; im Druck (submitted 09.10.2008, accepted 28.04.2009).

[3] Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC–MS/MS. *Mycotoxin Research.* 2006;22:189-192.

[4] Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Detection of satratoxin G and H in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia.* 2008;166:103-107.

Publikation	Experimenteller Teil			Manuskript		
	Methodenentwicklung	Probenaufarbeitung und Messung	Auswertung	Einleitung	Material/Methoden	Ergebnisse/Diskussion
1	CG JB	CG JB	CG JB	CG	CG	CG
2	CG JB	CG JB	CG JB	CG	CG	CG
3	CG	CG	CG	CG	CG	CG
4	CG	CG	CG	CG	CG	CG

CG: Christoph Gottschalk

JB: Jörg Barthel

Publikation 1:

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51:1547-1553.

Research Article

Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products

Christoph Gottschalk¹, Jörg Barthel², Gabriele Engelhardt², Johann Bauer¹, Karsten Meyer¹

¹ TU München, Institute of Animal Hygiene, Freising, Germany

² Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleißheim, Germany

Among cereals, oats are known to be very frequently contaminated with type A trichothecenes and so they can play a major role in the exposition of the consumer to these mycotoxins. Seventy representative oat samples of both conventional and organic production were drawn at mills and at wholesale stage according to Commissions Regulation (EC) No 401/2006 and analyzed for nine type A trichothecenes by LC-MS/MS. High contamination rates were found for most of the toxins in conventional as well as in organic products (e.g. 100% for T-2 toxin or 99% for HT-2 toxin). The mean concentration of T-2/HT-2 (sum of the toxins) was $17 \pm 18 \mu\text{g}/\text{kg}$ (mean \pm SD) in all samples, $27 \pm 21 \mu\text{g}/\text{kg}$ in conventional, and $7.6 \pm 4.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ in organic products, respectively. The highest T-2/HT-2 level has been determined in conventionally produced oat flakes ($85 \mu\text{g}/\text{kg}$). The mean level of T-2 tetraol ($9.5 \pm 7.7 \mu\text{g}/\text{kg}$) in all samples was found to be even higher than that of T-2 ($5.1 \pm 6.0 \mu\text{g}/\text{kg}$), whereas levels of T-2 triol, 4,15-diacetoxyscirpenol, 15-monoacetoxyscirpenol, and neosolaniol were considerably lower. For oats and oat products from organic farming contamination levels of T-2, HT-2, T-2 triol, T-2 tetraol, and neosolaniol were significantly lower. The results are discussed with respect to possible health risks for the consumer.

Keywords: Mycotoxin / Organic farming / T-2 tetraol / T-2 toxin / Trichothecenes

Received: April 16, 2007; revised: August 14, 2007; accepted: August 17, 2007

1 Introduction

The infection of cereals and corn with *Fusarium* spp. is a worldwide problem and already takes place on the field during the flowering period. Apart from the economic damage caused by *Fusarium*-derived diseases of the plant leading to yield losses or cereals of poor quality, the ability of certain species of this fungus to produce mycotoxins like fumonisins, zearalenone (ZEA) and trichothecenes is a problem concerning food and feed safety. Trichothecenes are cyclic sesquiterpenoids with an epoxid group and are

known as a large group of cytotoxic and immunosuppressive mycotoxins [1]. According to their chemical structures they are divided into four groups (A–D), while group A and B are the most important in cereals and cereal-based food. *F. sporotrichioides* and the newly described species *F. langsethiae* are the main producers of type A trichothecenes like T-2 toxin (T-2) and HT-2 toxin (HT-2) (Fig. 1) in European cereals [2, 3]. Oats and maize are considered the most contaminated with this group of toxins [4]. In 2001, the Scientific Committee on Food has proposed a temporary tolerable daily intake (tTDI) for the sum of T-2 and HT-2 of $0.06 \mu\text{g}/\text{kg}$ body weight [5]. According to mean intake data provided by a study of the Scientific Cooperation the ingestion of type A trichothecenes could exceed this tTDI especially in the group of infants and children by more than 5-fold [4]. So far, the European Commission (EC) has set maximum levels for the *Fusarium*-mycotoxins deoxynivalenol (DON) and ZEA. Already proposed maximum levels for fumonisins shall apply from 1 October 2007 if no other levels will be considered. Concerning T-2 and HT-2, the EC claimed urgently for more occurrence data of these toxins

Correspondence: Christoph Gottschalk, TU München, Institute of Animal Hygiene, Weihenstephaner Berg 3, D-85354 Freising, Germany

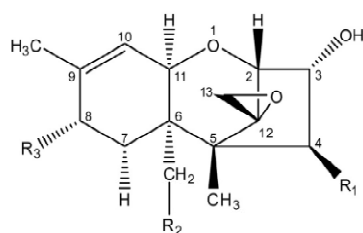
E-mail: christoph.gottschalk@wzw.tum.de

Fax: +49-8161-714516

Abbreviations: **DacVOL**, 4,15-diacetylverrucarol; **DAS**, 4,15-diacetoxyscirpenol; **DON**, deoxynivalenol; **EC**, European Commission; **HT-2**, HT-2 toxin; **MAS**, 15-monoacetoxyscirpenol; **MRM**, multiple reaction monitoring mode; **NEO**, neosolaniol; **T-2**, T-2 toxin; **tTDI**, temporary tolerable daily intake; **VOL**, verrucarol; **ZEA**, zearalenone

C. Gottschalk *et al.*

Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1547–1553



Trichothecene type A	MW	R ₁	R ₂	R ₃
T-2 toxin	466	OAc	OAc	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2 toxin	424	OH	OAc	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 triol	382	OH	OH	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 tetraol	298	OH	OH	OH
4,15-Diacetoxyscirpenol	366	OAc	OAc	H
15-Monoacetoxyscirpenol	324	OH	OAc	H
Neosolaniol	382	OAc	OAc	OH
4,15-Diacetylverrucarol	350	OAc	OAc	H
Verrucarol	266	OH	OH	H

Figure 1. Chemical structures of nine type A trichothecenes [1].

especially in oats and oat products and, if necessary, will establish an appropriate maximum level presumably until 1 July 2008 [6].

In this project, data on the contamination rates and levels of type A trichothecenes of representative oat samples are presented. Furthermore, the influence of the agricultural practice on amounts of type A trichothecenes has been examined. The production of organic food in Europe has increased remarkably during the last years [7]. In the first nine months of the year 2006, the expenses of private households in Germany for organic products have grown about 17% compared with the year before. Organic food achieved a market share of 2.7% of the overall food market [8]. In the 1990s, this share was roughly 1% of the total consumption of food [9]. Nevertheless, organic farming and the relation to mycotoxin contamination is still very diversely discussed. While some authors did not observe any effects on *Aspergillus*-, *Penicillium*- or *Fusarium*-mycotoxins, others described higher or lower amounts of mycotoxins in organic products [10]. Data published so far mainly concern the influence on aflatoxins, ochratoxin A, ZEA, and DON, but not on type A trichothecenes like T-2 and HT-2. The results obtained in this study are discussed and the levels of mycotoxin contamination are evaluated with respect to possible health risks for the consumer.

2 Materials and methods

2.1 Sampling

Seventy representative samples (35 from conventional farming, 35 from organic farming) have been analyzed. Since mycotoxins can be distributed very heterogeneously in one lot, a representative sampling in determination of mycotoxins is highly important. Therefore, sampling has been performed according to Commissions Regulation (EC) No 401/2006 [11]. All samples were at least cleaned and de-hulled oats intended for human consumption. Nine samples were oats, 43 oat flakes, eleven oat bran, and seven oat-containing infant food. The samples were drawn at mills and at wholesale stage from the Bavarian market and were all of German origin of the production year 2005.

2.2 Chemicals and reagents

Standards of the type A trichothecenes T-2, HT-2, 4,15-diacetoxyscirpenol (DAS), 15-monoacetoxyscirpenol (MAS), T-2 triol, T-2 tetraol, neosolaniol (NEO), 4,15-diacetylverrucarol (DacVOL), and verrucarol (VOL) were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany). ACN for extraction (HPLC grade) was purchased from Riedel-de Haën (Deisenhofen, Germany). Methanol (Riedel-de Haën) and ammonium formate (Fluka, Deisenhofen, Germany) were used in LC-MS quality. Water was purified on a milli-Q water purification system (Millipore, Schwalbach, Germany).

2.3 Sample preparation

Before analysis, the complete aggregate samples were finely ground and homogenized in the laboratory. The sub-samples (20 g) were extracted with 80 mL ACN/water 84/16 v/v by blending at high speed (9500 rpm, 3 min) on an Ultra Turrax homogenizer (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany). The extracts were centrifuged (5000 rpm, 10 min) and aliquots of 8 mL were purified with MycoSep® columns (#226, Coring System Diagnostix, Germany). This procedure has been successfully applied for similar LC-MS/MS multi-mycotoxin analyses [12, 13]. Four milliliters of the extracts were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at a temperature of 40°C (Barkey, Leopoldshöhe, Germany). For LC-MS/MS analysis the residues were dissolved in 1 mL of methanol/deionized water 5/95 v/v and filtered through a 0.45 µm PTFE syringe filter (Supelco, Deisenhofen, Germany).

2.4 LC-MS/MS analysis

LC-MS/MS analysis was performed with a high pressure gradient HPLC apparatus from Shimadzu (Duisburg, Germany) and a triple quadrupole mass spectrometer API 4000

Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1547–1553

Table 1. MRM transitions, declustering potentials and collision energies for nine type A trichothecenes

Analyte	Precursor Ion [M+NH ₄] ⁺		Fragment Ions		
	Q1	DP (V)	Q3		CE (eV)
T-2	483.9	61	305.2	Quantifier	19
			215.2	Qualifier	25
HT-2	442.4	51	263.2	Quantifier	17
			215.1	Qualifier	19
T-2 triol	400.4	36	281.2	Quantifier	17
			215.1	Qualifier	13
T-2 tetraol	316.2	36	215.2	Quantifier	13
			281.3	Qualifier	11
DAS	384.2	51	307.3	Quantifier	17
			247.1	Qualifier	19
MAS	342.2	41	265.1	Quantifier	13
			107.1	Qualifier	19
NEO	400.2	51	305.3	Quantifier	17
			245.1	Qualifier	25
DacVOL	368.3	51	291.2	Quantifier	7
			249.1	Qualifier	11
VOL	284.2	36	267.2	Quantifier	13
			249.3	Qualifier	21

from Applied Biosystems (Darmstadt, Germany). The LC system consisted of an autosampler (SIL HT-C), two pumps (LC-10ADVP), a degasser (DGLU-14A), and a column oven (CTO-10ACVP). As analytical column a SynergiTM polar-RP[®] 150 × 2 mm, 4 μm (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) was used. For chromatographic separation of the analytes a binary linear gradient was applied which consisted of eluent A (methanol + 5 mmol/L ammonium formate) and eluent B (deionized water) with a flow rate of 0.4 mL/min: 0 min 95% B, 11 min 95% B, 22 min 35% B, 26 min 35% B, 27 min 95% B, 35 min 95% B. The column oven temperature was maintained at 40°C and the injection volume was 20 μL.

For all analytes, MS experiments were carried out in positive ESI mode. The source temperature was set at 500°C and the nitrogen pressure of the nebulizer gas has been optimized with 55 psi. For the other parameters like the curtain gas, the heating gas and the ion spray voltage best sensitivity could be achieved by splitting the method in periods with different optimal values. For T-2 tetraol the pressure of curtain gas has been set at 25 psi, of heating gas at 55 psi and ion spray voltage at 3000 V, while for the other toxins 20 psi, 50 psi and 4500 V were used, respectively. All analytes were measured as adduct ions of ammonium [M+NH₄]⁺. The toxins were identified in multiple reaction monitoring mode (MRM) by two specific fragment ions of one precursor ion according to Commissions Decision 2002/657/EC [14]. The MRM-transitions, declustering potentials and collision energies of the toxins are shown in Table 1.

2.5 Method validation and mycotoxin quantification

Recovery experiments were carried out using fortified oat samples at three levels (1 μg/kg, 10 μg/kg and 50 μg/kg) with five replicates each. The contamination with the trichothecene standard mix has been accomplished before extraction.

Quantification of the toxins was performed by external calibration. The LOD/LOQ was calculated by the S/N approach and ranged from 0.01/0.04 μg/kg for MAS to 0.3/0.8 μg/kg for VOL. For the evaluation of the results, levels of toxins between LOD and LOQ were calculated with half LOQ. The results were corrected by mean recovery rates obtained from the recovery experiments. Statistical analyses were carried out using SigmaStat 9.0. A two way ANOVA has been applied for the assessment of the influence of the agricultural practice and to consider possible influences of different food commodities.

3 Results and discussion

3.1 Recovery experiments

The recoveries obtained with this method ranged between 91 and 110% for all toxins with a RSD from 0.9 to 6.4%. Only T-2 tetraol showed a lower recovery rate of 60% and a RSD of 5.0%, but all were considered to comply with the requirements of the EC [11].

3.2 Occurrence of type A trichothecenes

Seventy oat samples from conventional and organic farming have been analyzed for nine type A trichothecenes. The contamination rates of conventionally as well as organically produced oats and oat products were very high for most of the analytes. The rates of T-2, HT-2, MAS, and NEO ranged between 97 and 100% in samples from both production types. Incidences higher than 90% were also found for T-2 tetraol and DAS in conventional samples. However, in organic samples, the incidences were lower with 83 and 71%, respectively. T-2 triol was determined in 77% of the conventional and 40% of the organic samples. VOL and DacVOL were not detected in any sample. In SCOOP task 3.2.10, far lower contamination rates of 16% for T-2, 41% for HT-2 or 0% for DAS were reported for 464 oat samples, possibly due to higher LOD's of the methods applied (5–30 μg/kg). In the SCOOP-study, no oat samples have been analyzed for T-2 triol, T-2 tetraol, MAS, NEO, VOL or DacVOL [4].

The mean concentration of T-2 and HT-2 (sum of the toxins) in all 70 samples was 17 ± 18 μg/kg (mean ± SD). Twenty-one percent of the samples showed T-2/HT-2 levels higher than 25 μg/kg, 7.1% were higher than 50 μg/kg. Conventionally produced samples had a mean T-2/HT-2

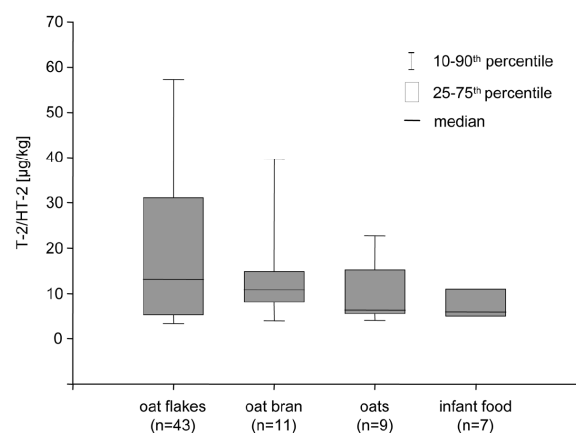


Figure 2. Comparison of contamination levels of oats and oat products with T-2 and HT-2 (sum of the toxins).

contamination of 27 ± 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$, samples from organic production were contaminated with 7.6 ± 4.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. It was noticeable that the level of HT-2 usually was about 2-fold as high as that of T-2. In addition, the mean contamination level of T-2 tetraol in all samples (9.5 ± 7.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was found to be even higher than that of T-2 (5.1 ± 6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A study from Schollenberger *et al.* [15] showed a similar relation between T-2, HT-2 and T-2 tetraol in oats originating from Germany even though the mean levels were higher. Klötzel *et al.* [12] also highlighted the high contamination levels of T-2 tetraol in oat samples. Compared to the high

levels found for T-2, HT-2 and T-2 tetraol, the mean contamination levels for T-2 triol, DAS, MAS, and NEO were all below 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. By contrast, one study from Poland reported a mean burden of oats with DAS of 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with an incidence of 12% [16].

Comparing the different food commodities, the highest contamination levels of all samples were found in oat flakes (Fig. 2) with a T-2/HT-2 mean value of 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and a maximum of 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in a conventional oat flake sample (Table 2). Surprisingly, the bran samples were contaminated with lower values than oat flakes. It could be assumed that oats used for oat flake production may be of lower quality than bran intended for human consumption. The lower levels in the bran indicate that this fraction might have been accurately separated from hulls during oat processing. Other studies examined that the toxin amount of oats is lowered by over 90% after de-hulling the kernel [17, 18]. The samples analyzed in this study, however, were exclusively de-hulled oats. Finally, the lowest levels were found in infant food (mean T-2/HT-2 contamination 7.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

3.3 Influence of the agricultural practice

Equal shares ($n=35$) of samples originating both from organic and conventional agriculture were analyzed for examining the influence of the agricultural practice. The amount of type A trichothecenes found in organic products differed considerably from that in conventional products. A statistically significant difference has been calculated for

Table 2. Results from 43 samples of oat flakes (25 conventional and 18 organic products) on type A trichothecene contamination

Analyte	Agricultural practice	Contamination rate (%)	Mean value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Median ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	95 th percentile ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Maximum value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
T-2	organic	100	1.7	1.2	4.9	5.2
	conventional	100	9.8	8.4	21	34
	both	100	6.4	4.3	17	34
HT-2	organic	100	5.2	4.3	12	15
	conventional	100	21	18	47	51
	both	100	14	8.7	44	51
T-2 + HT-2	organic	100	6.9	5.5	17	20
	conventional	100	31	26	66	85
	both	100	21	13	64	85
T-2 triol	organic	39	0.18	< LOD	0.69	1.1
	conventional	84	0.85	0.91	1.6	2.7
	both	65	0.57	0.25	1.5	2.7
T-2 tetraol	organic	78	5.2	4.2	14	27
	conventional	100	14	13	26	34
	both	91	11	9.4	26	34
DAS	organic	67	0.04	0.04	0.11	0.14
	conventional	100	0.11	0.09	0.21	0.38
	both	86	0.08	0.04	0.17	0.38
MAS	organic	94	0.08	0.07	0.18	0.24
	conventional	96	0.13	0.08	0.28	0.66
	both	95	0.11	0.08	0.24	0.66
NEO	organic	100	0.16	0.07	0.55	1.1
	conventional	100	0.85	0.68	2.0	2.7
	both	100	0.56	0.34	1.9	2.7

Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1547–1553

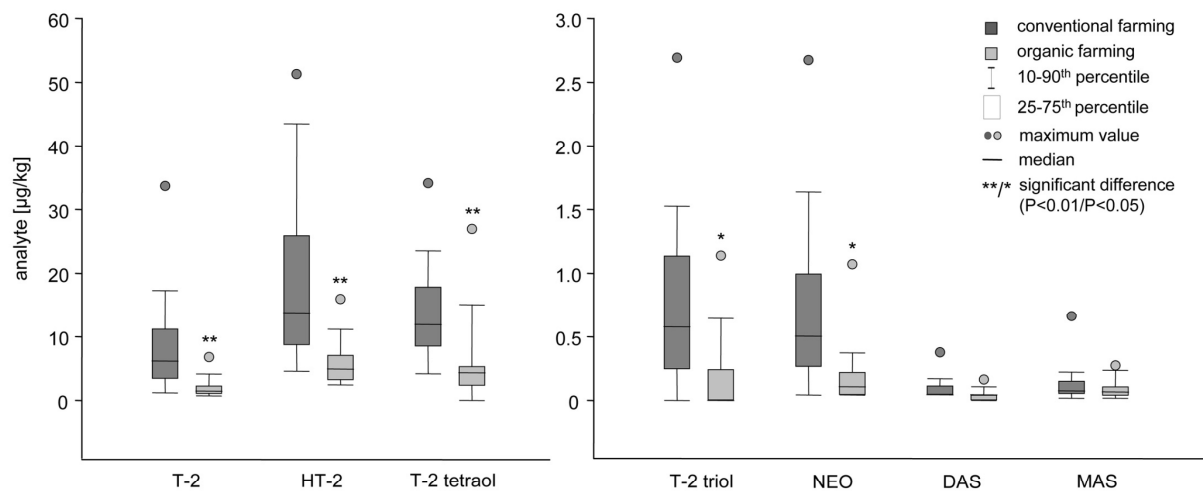


Figure 3. Comparison of contamination levels of type A trichothecenes in oats and oat products originating from conventional (n=35) and organic farming (n=35).

T-2, HT-2, T-2 tetraol ($p < 0.01$), T-2 triol, and NEO ($p < 0.05$) by two way ANOVA also after allowing for effects of differences in food commodities (Fig. 3). Values of DAS and MAS were very low without any significant difference.

The influence of the agricultural practice on mycotoxin contamination of cereals is controversially discussed. Our findings concerning T-2 and HT-2 are supported by the reports of Edwards *et al.* [17] and Pettersson [19]. In addition, Schollenberger *et al.* [20, 21], Schneweis *et al.* [22], Meister [23, 24] and Döll *et al.* [25] also found lower values in organic products when analyzing samples for DON or ZEA. However, these toxins are produced by different *Fusarium* species than type A trichothecenes, but the influence of the agricultural practice on these fungi should be similar. In contrast, Jestoi *et al.* [26], Pussemier *et al.* [27] and Marx *et al.* [28] reported no or negative effects of organic farming on the contamination with DON and ZEA. A study of Birzele *et al.* [29] showed contradictory results of infection rates and mycotoxin levels depending on climatic conditions and fungicide utilization. High humidity during the flowering period of wheat led to high grain infection rates and higher DON levels in organic wheat than in conventionally produced wheat treated by fungicides. In another year with moderate humidity during flowering, a lower DON burden occurred in cereals from the organic farming system.

An examination of the influence of the agricultural practice requires the same environmental factors like temperature, humidity and soil conditions or preceding crops for a proper study. Nevertheless, these requirements usually cannot be fulfilled for market-orientated supply studies or surveys. Schneweis *et al.* [22] conducted a field trial with winter wheat under the same environmental influences and concluded that DON and ZEA concentrations were in fact higher in conventionally than in organically produced

wheat. Thus, a direct relation between the agricultural practice and the concentration of certain *Fusarium* toxins could be shown.

In general, an intensive tilling, the compliance with special crop rotations and a less closely sowing as basic principles of organic agriculture practices could be regarded as reasons for lower fungi and mycotoxin burden. Furthermore, it has been observed that the non-application of insecticides and fungicides in organic production did not lead to higher mycotoxin contamination rates or concentrations in foodstuffs [30]. The use of synthetic nitrogen fertilizers in conventional agriculture can also be a reason for higher mycotoxin levels because the increased growth speed comes along with thinner cell walls of the plant, which facilitates a mold infection [31].

3.4 Dietary intake estimation

The toxicity of T-2 and HT-2 has been evaluated by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and by the Scientific Committee on Food of the EC. Both of them have calculated a tTDI of 0.06 µg/kg body weight for the sum of T-2 and HT-2 [5, 32]. A problem in performing dietary exposure assessments is always the lack of sufficient consumption data, particularly for certain sub-populations like infants or children. This is the consumer group with the highest risk, because they have an exceptionally high intake in relation to their body weight. According to recently published consumption data for children aged 2.5-years (mean body weight 16.15 kg), the mean consumption of oat flakes by this subpopulation is quoted with 3.1 g/day [33]. T-2/HT-2 intake estimates were conducted as follows for a mean case (average consumption \times mean toxin concentration) and a bad case scenario (average consumption \times 95th percentile value of toxin concentration).

C. Gottschalk *et al.*

Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1547–1553

Mean case scenario: Assuming the consumption of conventionally produced oat flakes with a mean contamination of 31 µg/kg T-2/HT-2 (Table 2) a total intake of 0.096 µg or 9.9% of the tTDI was calculated. The consumption of organic oat flakes (6.9 µg/kg) resulted in a total intake of 0.021 µg or 2.2% of the tTDI.

Bad case scenario: The consumption of conventionally produced oat flakes with a 95th percentile contamination of 66 µg/kg T-2/HT-2 (Table 2) led to an intake of 0.205 µg corresponding to 21% of the tTDI. For organic products (17 µg/kg) an intake of 0.053 µg or 5.4% of the TDI was calculated. Consequently, the lower toxin burden of organic oat flakes resulted in about 25% of the intake by conventional oat flakes. It can be concluded from SCOOP and JECFA data [4, 32], that oats contribute only to about 15% to the total daily intake of T-2/HT-2. Wheat, however, which was shown to have considerably lower type A trichothecene contamination levels, contributes to more than 60% due to European consumption habits. Anyway, the contribution of oats to the daily exposure especially of the subpopulation of infants and young children should be considered because of its high contamination levels.

4 Concluding remarks

In this study, statistically significant differences between organic and conventional farming could be demonstrated for the first time for specific type A trichothecenes in representative oat samples. All samples which exceeded a level of 50 µg/kg for the sum of T-2 and HT-2 originated from conventional production. In comparison with T-2 and HT-2 levels found in oats originating from countries in Northern Europe [34, 35], the contamination levels obtained in this survey were remarkably lower. These levels, however, referred to de-hulled oats which differ remarkably from levels in raw oats [17, 18]. Anyway, T-2 and HT-2 as well as T-2 tetraol were shown to play a major role in the total trichothecene type A burden of oats and oat products. Since mean levels of T-2 tetraol were found to be even higher than that of T-2, the occurrence of this type A trichothecene should be further studied and evaluated.

The authors want to thank the team of the mycotoxin laboratories for their unhesitant help and labor in grinding, homogenization and preparation of the samples. Financial support by the Bavarian State Ministry of the Environment, Public Health and Consumer Protection, project UGV04040803050.

5 References

- [1] Ueno, Y., *Trichothecene-Chemical, biological and toxicological aspects*, Elsevier, Amsterdam 1983.
- [2] Torp, M., Nirenberg, H. I., *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe, *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 95, 247–256.
- [3] Thrane, U., Adler, A., Clasen, P.-E., Galvano, F., *et al.*, Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*, *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 95, 257–266.
- [4] European Commission, Scientific Cooperation: SCOOP Task 3.2.10: Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by population of EU Member States, Directorate-General Health and Consumer Protection 2003.
- [5] European Commission, Scientific Committee on Food: Opinions of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* Toxins, Part 5, Directorate-General Health and Consumer Protection 2001.
- [6] European Commission, Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Off. J. Eur. Union* 2006, L364, 5–24.
- [7] Hamm, U., Gronefeld, F., Halpin, D., Analysis of the European market for organic food, *Organic Marketing Initiatives and Rural Development*, School of Management and Business, University of Wales, Aberystwyth, UK 2002.
- [8] GfK Panel Services Deutschland, Organic food products surge ahead, Press Release, GfK Group Nuremberg, January 11, 2007, http://www.gfk.com/group/infopool/press_releases/001133/index.en.html (assessed on March 11, 2007).
- [9] Woese, K., Lange, D., Boess, C., Bögl, K. W., A comparison of organically and conventionally grown foods-Results of a review of the relevant literature, *J. Sci. Food Agric.* 1997, 74, 281–293.
- [10] Magkos, F., Arvaniti, F., Zampelas, A., Organic food: Buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006, 46, 23–56.
- [11] European Commission, Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, *Off. J. Eur. Union* 2006, L70, 12–34.
- [12] Klötzel, M., Gutsche, B., Lauber, U., Humpf, H. U., Determination of 12 Type A and B Trichothecenes in cereals by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 8904–8910.
- [13] Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Krška, R., Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2004, 1062, 209–216.
- [14] European Commission, Commission Decision (EC) No 657/2002 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Union* 2002, L221, 8–36.
- [15] Schollenberger, M., Müller, H.-M., Rülle, M., Suchy, S., *et al.*, Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany, *Mycopathologia* 2006, 161, 43–52.
- [16] Perkowski, J., Basinski, T., Natural contamination of oat with group A trichothecene mycotoxins in Poland, *Food Add. Contam.* 2002, 19, 478–482.

Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1547–1553

- [17] Edwards, S., Scudamore, K., Fusarium mycotoxins in UK oats – Impact of agronomy and processing, *Conference Transcript 29th Mycotoxin-Workshop*, May 14–16, Stuttgart-Fellbach, Germany 2007.
- [18] Hazel, C., Scudamore, K., Fate of Fusarium mycotoxins in Cereal Food Chain, *EC Fusariumtoxin Forum*, January 15–16, Brussels 2007.
- [19] Pettersson, H., Occurrence of T-2 and HT-2 toxins in oats in the European Union since 1994, *EC Fusariumtoxin Forum*, January 15–16, Brussels 2007.
- [20] Schollenberger, M., Suchy, S., Jara, H. T., Drochner, W., *et al.*, A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany, *Mycopathologia* 1999, 147, 49–57.
- [21] Schollenberger, M., Jara, H. T., Suchy, S., Drochner, W., *et al.*, *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany, *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 72, 85–89.
- [22] Schneweis, I., Meyer, K., Ritzmann, M., Hoffmann, P., *et al.*, Influence of organically or conventionally produced wheat on health, performance and mycotoxin residues in tissues and bile of growing pigs, *Arch. Anim. Nutr.* 2005, 59, 155–163.
- [23] Meister, U., *Fusarium* toxins in bread cereals of the Land Brandenburg—Comparison of integrated/ecological cultivation of 2000 to 2002, *Mycotoxin Research* 2003, 19, 157–161.
- [24] Meister, U., *Fusarium* toxins in bread cereals of the land Brandenburg in the years 2000 to 2004—Comparison of integrated and ecological cultivation, *Mycotoxin Research* 2005, 21, 231–236.
- [25] Döll, S., Valenta, H., Dänicke, S., Flachowsky, G., *Fusarium* mycotoxins in conventionally and organically grown grain from Thuringia/Germany, *Landbauforsch. Volk.* 2002, 52, 91–96.
- [26] Jestoi, M., Somma, M. C., Kouva, M., Veijalainen, P., *et al.*, Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets, *Mol. Nutr. Food Res.* 2004, 48, 299–307.
- [27] Pussemier, L., Piérard, J.-Y., Anselme, M., Tangni, E. K., *et al.*, Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat, *Food Add. Contam.* 2006, 23, 1208–1218.
- [28] Marx, H., Gedek, B., Kollarczik, B., Vergleichende Untersuchungen zum mykotoxikologischen Status von ökologisch und konventionell angebautem Getreide, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1995, 201, 83–86.
- [29] Birzele, B., Meier, A., Hindorf, H., Krämer, J., *et al.*, Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany, *Eur. J. Plant Pathol.* 2002, 108, 667–673.
- [30] Food and Agriculture Organization of the United Nations, *Food safety and quality as affected by organic farming*, Twenty second FAO regional conference for Europe, Porto, Portugal 2000.
- [31] Heaton, S., *Organic Farming, Food Quality and Human Health*, Soil Association, Bristol 2001.
- [32] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*, WHO Food Additives Series 47, Geneva 2001.
- [33] Banasiak, U., Hesecker, H., Sieke, C., Sommerfeld, C., *et al.*, Abschätzung der Aufnahme von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in der Nahrung mit neuen Verzehrsmengen für Kinder, *Bundesgesundheitsbl.–Gesundheitsforsch.–Gesundheitsschutz* 2005, 48, 84–98.
- [34] Langseth, W., Rundberget, T., The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals, *Mycopathologia* 1999, 147, 157–165.
- [35] Pettersson, H., Börjesson, T., T-2 and HT-2 Toxins in Oats, *Conference Transcript 28th Mycotoxin-Workshop*, May 29–31, Bydgoszcz, Poland 2006.

Publikation 2:

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. Food Add Contam. 2009; im Druck (submitted 09.10.2008, accepted 28.04.2009).

Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products

Christoph Gottschalk^{a*}, Jörg Barthel^b, Gabriele Engelhardt^b, Johann Bauer^a and Karsten Meyer^a

^aTechnische Universität München, Institute of Animal Hygiene, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany;

^bBavarian Health and Food Safety Authority, Veterinärstraße 2, 85764 Oberschleißheim, Germany

(Received 9 October 2008; final version received 28 April 2009)

A sensitive LC–MS/MS method for the simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes in cereals is presented. The limits of detection ranged between 0.1 and 0.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for all analytes. The method was applied to 289 representatively drawn samples of wheat, rye and oat products. Ninety-four percent of the wheat samples ($n=130$), 95% of the rye samples ($n=61$) and 100% of the oat samples ($n=98$) were contaminated with the type A trichothecenes T-2 and HT-2 toxin. Median levels of T-2/HT-2 (sum of the toxins) were 0.91, 0.53 and 8.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Highest levels were found in wheat bran (24 $\mu\text{g kg}^{-1}$), rye kernels (3.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and oat flakes (85 $\mu\text{g kg}^{-1}$). All wheat and rye samples and 75% of the oat samples were contaminated with the type B trichothecene deoxynivalenol. Median levels of this toxin were 23, 15 and 0.53 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Highest levels were found in wheat bran (1160 $\mu\text{g kg}^{-1}$), rye kernels (288 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and oat flakes (55 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The type B trichothecene nivalenol was detected in 67% of the wheat samples, in 3% of the rye samples and in 24% of the oat samples with highest levels in wheat bran (96 $\mu\text{g kg}^{-1}$), rye kernels (1.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and in oat flakes (17 $\mu\text{g kg}^{-1}$), respectively. Levels of other type A and B trichothecenes played a minor role, although the rates of contamination were often high. Neither macrocyclic type D trichothecenes (satratoxin G and H, verrucarol A, roridin A) nor diacetylverrucarol and verrucarol (type A trichothecenes), were detected in any of the samples.

Keywords: chromatography; LC/MS; trichothecenes; cereals and grain; T-2 toxin; Satratoxin G

Abbreviations: 3-acDON, 3-acetyl-deoxynivalenol; 15-acDON, 15-acetyl-deoxynivalenol; C13-DON, $^{13}\text{C}_{15}$ -deoxynivalenol; C13-T-2, $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2 toxin; DAS, 4,15-diacetoxyscirpenol; DacVOL, 4,15-diacetylverrucarol; DON, deoxynivalenol; EC, European Commission; FX, fusarenon-X; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; MAS, 15-monoacetoxyscirpenol; NEO, neosolaniol; NIV, nivalenol; RA, roridin A; SG, satratoxin G; SH, satratoxin H; TDI, tolerable daily intake; VA, verrucarol A; VOL, verrucarol

Introduction

Approximately 300–400 secondary fungal metabolites have been recognized as mycotoxins (Bennett and Klich 2003). Of these, almost 150 belong to the large group of trichothecenes. These are cyclic sesquiterpenoids characterized by a 12,13-epoxide ring (WHO 1990). Trichothecenes are generally known as cytotoxic and immunosuppressive mycotoxins. They are mainly produced by certain species of *Fusarium*, as well as by species of the genera *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichothecium* and *Trichoderma*. Trichothecenes are divided into four groups according to their chemical structures (Ueno 1983). Type A trichothecenes are characterized by an oxygen function different from a carbonyl group at the C-8 position, while type B trichothecenes possess a carbonyl function at this position. Type C trichothecenes have a second epoxide group at C-7,8 or C-9,10, whereas type D trichothecenes contain a macrocyclic ring between C-4 and

C-15 (Figure 1). *Fusarium sporotrichioides* and *F. langsethiae* are the main producers of type A trichothecenes, such as T-2 and HT-2 toxin, in European cereals (Torp and Nirenberg 2004, Thrane et al. 2004). Oats and maize are considered to be most contaminated with this group of trichothecenes. Type B trichothecenes, such as deoxynivalenol (DON), are primarily produced by *F. graminearum* and *F. culmorum*, which play a major role in maize, wheat and rye (SCOOP 2003). Various multi-methods for the determination of these toxins in cereals have been developed in the past few years (Lagana et al. 2003, Berthiller et al. 2005, Biselli and Hummert 2005, Klötzel et al. 2005).

The macrocyclic type D trichothecenes are metabolites of *Myrothecium* spp. (e.g. roridin A, verrucarol A) and *Stachybotrys* spp. (e.g. satratoxin G and H) (Ueno 1983). While type A and B trichothecenes are commonly known as contaminants of food and feed, it

*Corresponding author. Email: christoph.gottschalk@wzw.tum.de

2 C. Gottschalk et al.

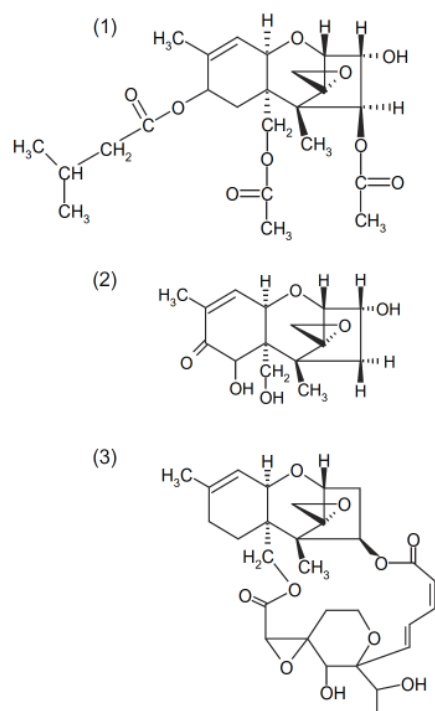


Figure 1. Examples of different structures of trichothecenes: (1) type A: T-2 toxin; (2) type B: DON; (3) type D: satratoxin G (Ueno 1983).

is assumed that macrocyclic trichothecenes rarely occur in these matrices (WHO 1990, Krska et al. 2001). However, these toxins have occasionally been determined in hay or straw and were identified as causative agents of stachybotryotoxicosis (Jarvis et al. 1986), a severe disease that primarily affects horses. Over the past few years, macrocyclic trichothecenes have attracted more attention as indoor pollutants. They are suspected to be responsible for several adverse health effects in humans living or working in *Stachybotrys*-affected environments (Johanning et al. 1996, Jarvis et al. 1998, Gottschalk et al. 2008). Regarding food, there are only a few studies focussing on these analytes. In 1980, Stack and Eppley (1980) first described a method for cereal grains with LODs between 100 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, but no naturally contaminated samples were analyzed. Recently published and more sensitive methods for type A, B and D trichothecenes in foodstuffs (Gentili et al. 2007, Stecher et al. 2007) included no satratoxins. Furthermore, only a very small number of samples was analyzed.

Maximum levels for trichothecenes in cereals and corn currently only exist for DON (Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 and No. 1126/2007). According to mean intake data provided by a study from the Scientific Cooperation, the dietary exposure to T-2 and HT-2 may be critical. Especially in the group of infants and children, the temporary tolerable

daily intake (tTDI) for the sum of these toxins could be exceeded by more than five-fold (SCOOP 2003). The EC thus requested more occurrence data of these toxins to establish an appropriate maximum level (Commission Regulation (EC) No. 1881/2006).

A sensitive LC-MS/MS multi-trichothecene method was developed in this study. Data regarding the contamination rates and levels of type A, B and the (at least in food) rarely studied type D trichothecenes in representatively drawn wheat, rye and oat samples are presented. Furthermore, the levels of mycotoxin contamination are compared and evaluated with respect to the possible health risks for the consumer.

Materials and methods

Samples

Sampling was performed according to Commission Regulation (EC) No. 401/2006. Samples (total $n = 289$) of wheat products ($n = 130$), rye products ($n = 61$), and oat products ($n = 98$) were collected from grain-milling factories or from wholesale in Bavaria. Products under study included kernels, flour, semolina, bran and flakes. A small number of these samples ($n = 18$) were oat- ($n = 13$) or wheat-containing ($n = 5$) infant food. All samples were of German origin from the crop years 2005 and 2006. The grain kernel samples were fully processed (including cleaning and dehulling steps), suitable for direct consumption. In addition to these food grain samples, 17 samples of oats of feed quality were included in this study.

Chemicals and reagents

Standards of the type A trichothecenes T-2 toxin, HT-2 toxin, 4,15-diacetoxyscirpenol, 15-monoacetoxyscirpenol, T-2 triol, T-2 tetraol, neosolaniol, 4,15-diacetylverrucarol, and verrucarol, standards of the type B trichothecenes deoxynivalenol, nivalenol, fusarenon-X, 3- and 15-acetyldeoxynivalenol as well as standards of the type D trichothecenes roridin A and verrucarol were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany). 13-C-Stable isotope standards for DON and T-2 toxin were from Biopure (Coring System Diagnostix, Gernsheim, Germany). Acetonitrile for extraction (HPLC-grade) was purchased from Riedel-de Haën (Deisenhofen, Germany). Methanol (Riedel-de Haën, Deisenhofen, Germany) and ammonium formate (Fluka, Deisenhofen, Germany) were used in LC-MS quality. Water was purified on a Milli-Q water purification system (Millipore, Schwalbach, Germany).

Standards of the type D trichothecenes satratoxin G and H were produced in our laboratory. A toxigenic strain of *Stachybotrys chartarum* was cultivated on rice (Jarvis et al. 1986). After a period of 8 weeks

at room temperature, cultures were extracted with acetonitrile/water (84:16, v/v) and the extracts were cleaned using MycoSep[®] #226 columns. The purified extracts were fractionated by semi-preparative HPLC with MS/MS-detection using a T-fitting to collect the fractions. A Beckman ultrasphere column (ODS, 150 × 4.6 mm, 5 μm) and a binary linear gradient of methanol (pump A) and deionized water (pump B) was used for separation of the toxins at a flow-rate of 1000 μl min⁻¹: 0 min 90% B, 40 min 0% B, 41 min 90% B, 45 min 90% B. The injection volume was 200 μl. The fractions were evaporated to dryness using a gentle stream of nitrogen at 40°C. The crystalline residues were then dissolved and stored in acetonitrile. The standards were verified and quantified using reference substances, which were kindly provided by Manfred Gareis (Max-Rubner Institute, Kulmbach, Germany).

Sample preparation

The complete aggregate samples (between 1 and 10 kg) were finely ground and homogenized before analysis. The sub-samples (20 g) were extracted with 80 ml acetonitrile/water (84:16, v/v) by blending at high speed (10,000 rpm, 3 min) with an Ultra Turrax homogenizer (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany). For some infant food samples, the double volume of extraction solvent was used owing to their high swelling properties. The extracts were centrifuged (6000 g, 10 min) and aliquots of 8 ml were purified with MycoSep[®] columns (#226; Coring System Diagnostix, Germany) according to the manufacturer's instructions. The MycoSep[®] method has successfully been applied by many other working groups (Berthiller et al. 2005, Biselli and Hummert 2005, Klötzel et al. 2005). As also observed by Stecher et al. (2007), the commonly used MycoSep[®] trichothecene column #227 was not suited for type D trichothecenes. Their high charcoal content led to very low recoveries (data not shown). A 4-ml aliquot of the extracts was evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen at a temperature of 40°C (Barkey, Leopoldshöhe, Germany). For LC-MS/MS analysis the residues were dissolved in 1 ml of methanol/deionized water (5:95, v/v) and were filtered through a 0.45 μm PTFE syringe filter (Supelco, Deisenhofen, Germany).

LC-MS/MS instrumentation and parameters

LC-MS/MS analysis was performed with a high pressure gradient HPLC apparatus from Shimadzu (Duisburg, Germany) and a triple quadrupole mass spectrometer API 4000 from Applied Biosystems (Darmstadt, Germany). The LC system consisted of an autosampler (SIL HT-C), two pumps (LC-10ADVP), a degasser (DGU-14A), and a column oven

(CTO-10ACVP). A Synergi[™] polar-RP[®] column, 150 × 2 mm, 4 μm (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) was used for the chromatographic separation of the analytes. The binary linear gradient consisted of eluent A (methanol + 5 mmol l⁻¹ ammonium formate) and eluent B (deionized water) with a flow rate of 0.4 ml min⁻¹: 0 min 95% B, 11 min 95% B, 22 min 35% B, 26 min 35% B, 27 min 95% B, 35 min 95% B. It was not possible to analyze T-2 tetraol and NIV in a single run due to similar retention times and ionization with different polarities. T-2 tetraol was determined in a second run with the following linear gradient: 0 min 70% B, 3 min 70% B, 5 min 30% B, 11 min 30% B, 11.5 min 70% B, 13 min 70% B. The column oven temperature was maintained at 40°C and the injection volume was 20 μl.

MS experiments were carried out in positive and negative electrospray ionization (ESI) mode by separating the method in periods with the proper polarity (Figure 2). The source temperature was set at 500°C and the nitrogen pressure of the nebulizer gas (GS1) was optimized at 55 psi. The collision gas (CAD gas, nitrogen) was used in high mode (CAD=9). The pressure of the curtain gas for T-2 tetraol was set at 25 psi, the heating gas at 55 psi and the ion spray voltage at 3000 V. For the other toxins best sensitivity was achieved with 20 psi, 50 psi and 4500 V, respectively. In positive ionization mode, all analytes were measured as adduct ions of ammonium [M + NH₄]⁺. The toxins were identified in multiple reaction monitoring mode (MRM) by two specific fragment ions of one precursor ion according to Commission Decision 2002/657/EC. The MRM transitions, de-clustering potentials (DP), collision energies (CE), cell exit potentials (CXP) and further parameters for each toxin are shown in Table 1. The value of the entrance potential (EP) was +10 V or -10 V for all analytes depending on their ionization polarity.

Method validation

The method performance parameters were determined according to DIN 32645 (1994). The trichothecene stock solution was diluted into 25 concentrations between 250 and 0.005 ng ml⁻¹. These standard dilutions were measured to determine the linearity of the method, the correlation as well as the limits of detection (LODs) and of quantification (LOQs). The latter were also calculated using the signal-to-noise (S/N) approach (S/N=3 and S/N=9, respectively). The repeatability of the method was checked by five-fold measurements of the toxin standards at two concentrations (1.0 and 10 ng ml⁻¹).

Recovery experiments were carried out after artificial contamination of homogenized, blank samples of wheat flour, rye flour and ground oat flakes on three

4 C. Gottschalk et al.

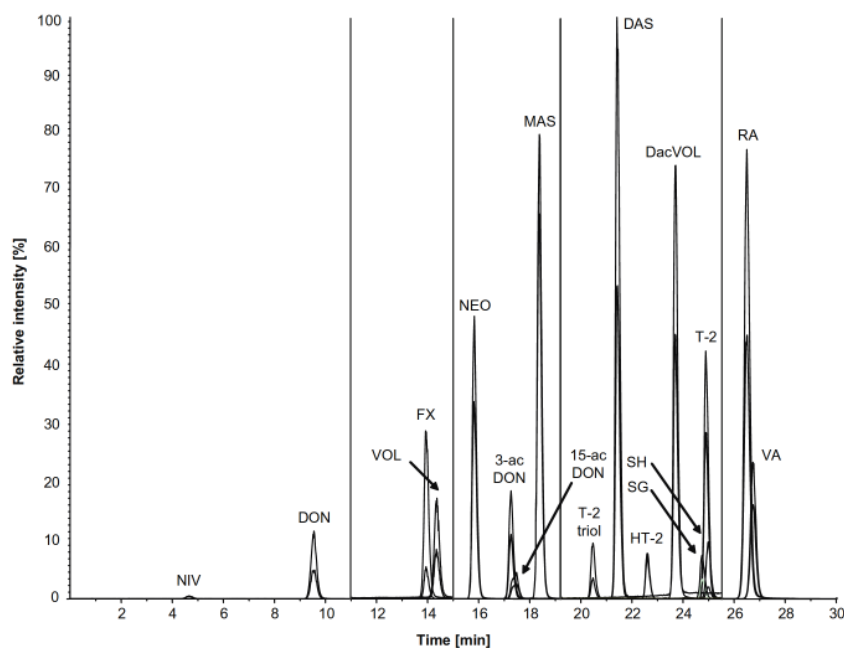


Figure 2. LC–MS/MS chromatogram (separated into five periods) of a multi-trichothecene standard (10 ng ml^{-1}) with two mass transitions per toxin (quantifier and qualifier).

levels (1.0 , 10 and $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) with five replicates each. The samples were fortified with a trichothecene standard mixture before extraction.

The accuracy of the method was checked by participation at an interlaboratory test for DON (DLA, Ahrensburg, Germany) and intra laboratory comparisons between the results of LC–MS/MS and HPLC–FLD (post-column derivatization) measurements according to the method described by Engelhardt et al. (2006). Comparison measurements for T-2 and HT-2 in oat flakes were conducted with another laboratory.

Mycotoxin quantification

Quantification of most of the toxins was done by external calibration on five levels (0 , 1.0 , 10 , 50 , 200 ng ml^{-1}). The ^{13}C -stable isotope standards ^{13}C -DON and ^{13}C -T-2 toxin were used for compensation of matrix suppression effects, which mainly occurred in wheat samples. After evaporation of the purified extracts, the residues were dissolved in eluent containing the ^{13}C -standards at a concentration of 10 ng ml^{-1} . To compensate for matrix effects which were also observed for NIV and T-2 tetraol, these two toxins were quantified by matrix-assisted calibration. Therefore, extracts of blank wheat flour, rye flour and ground oat flakes were used for the dilution of the toxin standards. Levels of toxins between the LOD and LOQ were calculated with half LOQ, at which the S/N values were applied. All results were corrected by mean recovery rates for each toxin

and matrix referring to the results of the recovery experiments.

Results

Method performance characteristics

According to DIN 32645, LODs/LOQs between $0.09/0.29 \mu\text{g kg}^{-1}$ for DAS and $0.70/2.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ for NIV were calculated. Using the signal-to-noise approach, these limits were mostly lower (Table 2). The repeatability ($n=5$) as RSD was between 1.8 and 11% at a concentration of 1 ng ml^{-1} . At a level of 10 ng ml^{-1} , all RSDs were between 0.5 and 4.4%. The method was linear between the LODs and $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ except for HT-2, VOL and SH (LOD: $200 \mu\text{g kg}^{-1}$) with correlation coefficients (linear regression) of $r > 0.9980$ (Table 2).

The average recovery obtained with this method ranged between 60 and 108% for all toxins and matrices with RSDs between 1.3 and 17%. The lowest recoveries were observed for NIV and T-2 tetraol (Table 3). The accuracy of the method was confirmed by participation in an interlaboratory test for DON and comparison measurements for DON and T-2/HT-2. The results showed a satisfactory accordance (Table 4). Finally, the results of the validation measurements were considered to comply with the requirements of the EC (Commission Regulation (EC) No. 401/2006).

Table 1. MRM transitions and MS parameters for type A, B, and D trichothecenes.

Analyte	MW (g mol ⁻¹)	Precursor ion	Product ion	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)	Dwell time (ms)
Type A trichothecenes							
T-2	466	[M + NH ₄] ⁺ 483.9	Quantifier 305.2	61	19	20	75
			Qualifier 215.2	61	25	14	75
¹³ C-T-2	490	[M + NH ₄] ⁺ 508.3	Quantifier 229.2	46	25	14	75
			Qualifier 322.2	46	19	20	75
HT-2	424	[M + NH ₄] ⁺ 442.4	Quantifier 263.2	51	17	16	75
			Qualifier 215.1	51	19	16	75
T-2 triol	382	[M + NH ₄] ⁺ 400.4	Quantifier 281.2	36	17	20	75
			Qualifier 215.1	36	13	18	75
T-2 tetraol	298	[M + NH ₄] ⁺ 316.2	Quantifier 215.2	36	13	20	150
			Qualifier 281.3	36	11	18	150
DAS	366	[M + NH ₄] ⁺ 384.2	Quantifier 307.3	51	17	10	75
			Qualifier 247.1	51	19	24	75
MAS	324	[M + NH ₄] ⁺ 342.2	Quantifier 265.1	41	13	16	125
			Qualifier 107.1	41	19	10	125
NEO	382	[M + NH ₄] ⁺ 400.2	Quantifier 305.3	51	17	18	125
			Qualifier 245.1	51	25	16	125
DacVOL	350	[M + NH ₄] ⁺ 368.3	Quantifier 291.2	51	13	20	75
			Qualifier 249.1	51	21	18	75
VOL	266	[M + NH ₄] ⁺ 284.2	Quantifier 267.2	36	7	16	125
			Qualifier 249.3	36	11	24	125
Type B trichothecenes							
DON	296	[M - H] ⁻ 294.9	Quantifier 265.0	-45	-16	-15	150
			Qualifier 138.0	-45	-22	-11	150
¹³ C-DON	311	[M - H] ⁻ 310.3	Quantifier 144.9	-55	-22	-7	150
			Qualifier 279.0	-55	-16	-13	150
3-acDON	338	[M + NH ₄] ⁺ 356.3	Quantifier 231.1	36	25	16	125
			Qualifier 203.0	36	21	22	125
15-acDON	338	[M + NH ₄] ⁺ 356.1	Quantifier 321.1	46	19	28	125
			Qualifier 137.2	46	21	14	125
NIV	312	[M + HCOO] ⁻ 357.1	Quantifier 281.0	-50	-18	-13	150
			Qualifier 202.8	-50	-24	-11	150
FX	354	[M + NH ₄] ⁺ 372.1	Quantifier 355.1	41	11	24	125
			Qualifier 247.2	41	19	16	125
Type D trichothecenes							
SG	544	[M + NH ₄] ⁺ 562.3	Quantifier 231.2	51	23	16	75
			Qualifier 249.2	51	21	18	75
SH	528	[M + NH ₄] ⁺ 546.5	Quantifier 529.2	36	21	20	75
			Qualifier 281.1	36	21	18	75
RA	532	[M + NH ₄] ⁺ 550.5	Quantifier 249.2	56	23	18	175
			Qualifier 533.4	56	15	18	175
VA	502	[M + NH ₄] ⁺ 520.4	Quantifier 249.1	51	23	18	175
			Qualifier 457.3	51	17	14	175

Trichothecene contamination of wheat samples

The samples ($n=130$) were analyzed for 18 type A, B and D trichothecenes. The levels of T-2/HT-2 in all wheat samples ranged between LOD and $24 \mu\text{g kg}^{-1}$ with a contamination rate of 94% and a median contamination of $0.91 \mu\text{g kg}^{-1}$. The 95th percentile value was $6.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 5). Hereby, a correlation between T-2 and HT-2 levels was observed ($r^2=0.7995$). The levels of HT-2 were about sevenfold as high as those of T-2 (Figure 3). Compared in Figure 4, the highest levels were found in wheat bran. Levels of contamination of the other commodities of wheat are also listed in Table 5. T-2 tetraol occurred in

53% of all samples with values between LOD and $83 \mu\text{g kg}^{-1}$ in a wheat bran sample. The median level, however, was only $0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$. Other type A trichothecenes, such as T-2 triol, NEO and DAS, were detected with lower frequency and in smaller amounts (Table 5). The rate of contamination with MAS was 92% but the levels were consistently low (median $0.11 \mu\text{g kg}^{-1}$, maximum value $5.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ in wheat bran). VOL and DacVOL were not detected above their LODs.

All wheat samples were contaminated with DON between 0.06 and $1160 \mu\text{g kg}^{-1}$. The median contamination was $23 \mu\text{g kg}^{-1}$ with a 95th percentile value of $162 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 5). Again, the highest value was

6 C. Gottschalk et al.

Table 2. Performance parameters of the LC-MS/MS method.

Analyte	Linearity* (ng ml ⁻¹)	Correlation <i>r</i> (calibration points)	RSD (<i>n</i> =5) 1 ng ml ⁻¹	RSD (<i>n</i> =5) 10 ng ml ⁻¹	DIN 32645**		Signal-to-noise***	
					LOD (ng ml ⁻¹)	LOQ (ng ml ⁻¹)	LOD (ng ml ⁻¹)	LOQ (ng ml ⁻¹)
Type A trichothecenes								
T-2	LOD – 250	0.9998 (15)	1.8%	2.2%	0.20	0.66	0.026	0.078
HT-2	LOD – 200	0.9995 (16)	3.3%	1.6%	0.32	1.1	0.061	0.18
T-2 triol	LOD – 250	0.9996 (15)	6.7%	4.4%	0.27	0.92	0.16	0.49
T-2 tetraol	LOD – 250	0.9992 (14)	6.5%	2.9%	0.41	1.4	0.10	0.30
DAS	LOD – 250	0.9999 (15)	4.1%	1.8%	0.085	0.29	0.030	0.089
MAS	LOD – 250	0.9999 (16)	2.2%	1.3%	0.085	0.29	0.012	0.035
NEO	LOD – 250	0.9999 (16)	3.8%	0.5%	0.11	0.35	0.029	0.087
DacVOL	LOD – 250	0.9999 (15)	3.1%	1.0%	0.064	0.22	0.017	0.051
VOL	LOD – 200	0.9995 (15)	7.6%	0.8%	0.34	1.1	0.27	0.82
Type B trichothecenes								
DON	LOD – 250	0.9999 (16)	2.8%	1.4%	0.092	0.31	0.038	0.11
3-acDON	LOD – 250	0.9996 (15)	8.4%	1.5%	0.28	0.96	0.14	0.42
15-acDON	LOD – 250	0.9999 (16)	4.7%	2.3%	0.14	0.46	0.033	0.10
NIV	LOD – 250	0.9980 (10)	11%	1.1%	0.70	2.2	1.2	3.6
FX	LOD – 250	0.9999 (16)	4.8%	1.1%	0.11	0.37	0.12	0.35
Type D trichothecenes								
SG	LOD – 250	0.9993 (15)	5.3%	1.4%	0.28	0.95	0.038	0.11
SH	LOD – 200	0.9993 (15)	9.1%	3.1%	0.38	1.3	0.15	0.46
RA	LOD – 250	0.9995 (15)	3.9%	1.7%	0.22	0.74	0.021	0.063
VA	LOD – 250	0.9996 (16)	2.5%	0.7%	0.20	0.67	0.044	0.13

Notes: *Calculated using *F*-test (Mandel); **uncertainty 33.3%; probability of error 1%; *n* = 1; ***used for quantification; LOD: *S/N* = 3, LOQ: *S/N* = 9.

Table 3. Average recovery rates of type A, B and D trichothecenes from wheat flour, rye flour and oat flakes (fortification levels: 1, 10 and 50 µg kg⁻¹; *n* = 5).

Analyte	Average recovery rate (%) ± RSD (%)		
	Wheat flour	Rye flour	Oat flakes
Type A trichothecenes			
T-2	108 ± 2.8	95 ± 6.1	103 ± 2.7
HT-2	98 ± 4.9	93 ± 10	102 ± 3.4
T-2 triol	97 ± 5.0	92 ± 3.7	99 ± 4.8
T-2 tetraol	73 ± 7.8	75 ± 8.4	60 ± 8.4
DAS	106 ± 1.3	101 ± 3.6	107 ± 2.6
MAS	101 ± 1.5	85 ± 5.4	97 ± 2.3
NEO	99 ± 5.0	90 ± 6.8	98 ± 3.3
DacVOL	96 ± 2.8	86 ± 3.6	96 ± 3.6
VOL	101 ± 5.3	83 ± 8.7	95 ± 6.8
Type B trichothecenes			
DON	92 ± 17	89 ± 11	98 ± 4.5
3-acDON	104 ± 5.0	96 ± 6.2	99 ± 4.6
15-acDON	98 ± 6.0	95 ± 6.4	102 ± 3.8
NIV	61 ± 16	67 ± 11	67 ± 8.7
FX	87 ± 4.9	84 ± 9.5	94 ± 4.7
Type D trichothecenes			
SG	91 ± 4.8	83 ± 6.3	98 ± 6.1
SH	87 ± 5.3	85 ± 5.8	92 ± 6.0
RA	107 ± 4.2	87 ± 6.9	89 ± 12
VA	78 ± 4.9	76 ± 5.3	81 ± 9.0

found in bran (Figure 4). However, this was the only sample to exceed the maximum level set by the EC (Commission Regulation No. 1881/2006). Sixty-seven percent of the samples were contaminated with NIV at a median level of 1.8 µg kg⁻¹ and a maximum level of 96 µg kg⁻¹ in wheat bran. The 3- and 15-acetyl metabolites of DON were detected in 52 and 72% of all wheat samples with median values of only 0.21 and 0.17 µg kg⁻¹, respectively. The highest levels of 15 and 26 µg kg⁻¹ were also found in wheat bran (Table 5). 15-acDON levels were about 2% of the DON levels (Figure 3). No type D trichothecenes were detected above their LODs between 0.02 µg kg⁻¹ for RA and 0.15 µg kg⁻¹ for SH.

Trichothecene contamination of rye samples

Rye samples (*n* = 61) were less contaminated with trichothecenes, even though the rates of contamination hardly differed from those of wheat. The median level of T-2/HT-2 in all rye samples was 0.53 µg kg⁻¹ with a the 95th percentile value of 1.8 µg kg⁻¹. The rate of contamination was 95% (Table 6) and a maximum level of 3.1 µg kg⁻¹ was measured in rye flour (Figure 4). Higher levels (median 2.0 µg kg⁻¹ and 95th percentile value 6.4 µg kg⁻¹) were observed for T-2 tetraol, with a rate of

Table 4. Trueness assessment of the method by interlaboratory tests and comparison measurements for T-2, HT-2 and DON.

Laboratory/method	Material	Analyte	Results	Results with this LC-MS/MS method	Accuracy
Interlaboratory test (DLA Ahrensburg, Germany; 28 participating laboratories)	Cereals for animal feed (DLA-05/2007)	DON	257 – 555 µg kg ⁻¹ (\bar{X} = 405 µg kg ⁻¹)	324 µg kg ⁻¹	Z-score = -1.1
Comparison measurement (Chair of Food Chemistry, Technische Universitaet Muenchen, Germany; stable isotope dilution assay – LC-MS/MS)	Oat flakes (1)	T-2	20 µg kg ⁻¹	18 µg kg ⁻¹	90%
	Oat flakes (2)	HT-2	50 µg kg ⁻¹	49 µg kg ⁻¹	98%
		T-2	20 µg kg ⁻¹	17 µg kg ⁻¹	85%
		HT-2	45 µg kg ⁻¹	44 µg kg ⁻¹	98%
Comparison measurement (Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleißheim, Germany; HPLC-FLD)	Wheat flour	DON	106 µg kg ⁻¹	113 µg kg ⁻¹	107%
	Whole wheat flour	DON	130 µg kg ⁻¹	121 µg kg ⁻¹	93%
	Wheat kernels	DON	158 µg kg ⁻¹	149 µg kg ⁻¹	94%
	Wheat bran (1)	DON	294 µg kg ⁻¹	325 µg kg ⁻¹	111%
	Wheat bran (2)	DON	1087 µg kg ⁻¹	1069 µg kg ⁻¹	98%

Table 5. Rates and levels of contamination of different commodities of wheat with the most relevant trichothecenes. All samples ($n = 130$), wheat flour ($n = 39$), whole wheat flour ($n = 11$), wheat kernels ($n = 52$), semolina ($n = 13$), wheat bran ($n = 10$) and wheat-containing infant food ($n = 5$).

Analyte	Commodity	Contamination rate (%)	Mean (µg kg ⁻¹)	Median (µg kg ⁻¹)	95th percentile (µg kg ⁻¹)	Maximum value (µg kg ⁻¹)
T-2	All wheat samples	85	0.21	0.09	0.91	1.9
	Wheat flour	85	0.09	0.04	0.17	1.2
	Whole wheat flour	100	0.16	0.15	0.25	0.25
	Wheat kernels	94	0.27	0.17	0.76	1.1
	Semolina	39	0.02	< LOD	0.06	0.08
	Wheat bran	100	0.84	0.60	1.8	1.9
HT-2	Infant food	40	0.04	< LOD	0.13	0.15
	All wheat samples	94	1.6	0.84	5.6	22
	Wheat flour	97	0.65	0.32	0.92	11
	Whole wheat flour	100	1.4	1.6	2.1	2.2
	Wheat kernels	100	1.9	1.4	4.4	5.8
	Semolina	54	0.13	0.09	0.45	0.67
T-2 + HT-2	Wheat bran	100	7.1	6.7	17	22
	Infant food	80	0.55	0.32	1.2	1.3
	All wheat samples	94	1.8	0.91	6.4	24
	Wheat flour	97	0.74	0.34	1.1	12
	Whole wheat flour	100	1.6	1.8	2.4	2.4
	Wheat kernels	100	2.2	1.9	5.2	6.8
T-2 triol	Semolina	54	0.15	0.09	0.50	0.74
	Wheat bran	100	7.9	7.6	19	24
	Infant food	80	0.59	0.36	1.3	1.3
	All wheat samples	18	0.08	< LOD	0.25	1.4
	Wheat flour	2.6	0.03	< LOD	< LOD	1.4
	Whole wheat flour	9.1	0.02	< LOD	0.12	0.25
	Wheat kernels	28	0.07	< LOD	0.25	0.25
	Semolina	n.d.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	Wheat bran	78	0.55	0.52	1.2	1.3
	Infant food	n.d.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

(continued)

8 C. Gottschalk et al.

Table 5. Continued.

Analyte	Commodity	Contamination rate (%)	Mean ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	95th percentile ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Maximum value ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
T-2 tetraol	All wheat samples	53	2.6	0.15	8.0	83
	Wheat flour	21	0.78	<LOD	1.4	25
	Whole wheat flour	73	1.5	1.7	3.2	3.4
	Wheat kernels	79	2.7	1.8	8.0	10
	Semolina	7.7	0.04	<LOD	0.19	0.46
	Wheat bran	100	17	4.2	65	83
	Infant food	20	0.03	<LOD	0.12	0.15
DAS	All wheat samples	3.1	0.01	<LOD	<LOD	0.25
	Wheat flour	2.6	0.01	<LOD	<LOD	0.25
	Whole wheat flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Wheat kernels	1.9	<LOD	<LOD	<LOD	0.25
	Semolina	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Wheat bran	22	0.05	<LOD	0.25	0.25
	Infant food	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MAS	All wheat samples	92	0.30	0.11	0.88	5.9
	Wheat flour	92	0.11	0.06	0.19	1.6
	Whole wheat flour	100	0.55	0.51	1.3	1.4
	Wheat kernels	98	0.27	0.21	0.67	0.86
	Semolina	62	0.02	0.02	0.05	0.06
	Wheat bran	100	1.6	0.83	4.9	5.9
	Infant food	80	0.04	0.02	0.11	0.12
NEO	All wheat samples	24	0.02	<LOD	0.11	0.40
	Wheat flour	2.6	<LOD	<LOD	<LOD	0.17
	Whole wheat flour	9.1	<LOD	<LOD	0.02	0.04
	Wheat kernels	40	0.03	<LOD	0.12	0.15
	Semolina	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Wheat bran	89	0.10	0.04	0.33	0.40
	Infant food	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
DON	All wheat samples	100	57	23	162	1163
	Wheat flour	100	45	25	110	613
	Whole wheat flour	100	39	13	116	131
	Wheat kernels	100	49	27	154	235
	Semolina	100	39	17	140	172
	Wheat bran	100	225	64	839	1163
	Infant food	100	12	9.9	22	24
3-acDON	All wheat samples	52	0.57	0.21	2.4	15
	Wheat flour	38	0.29	<LOD	0.77	5.2
	Whole wheat flour	64	0.44	0.21	1.5	1.8
	Wheat kernels	68	0.68	0.47	2.7	3.8
	Semolina	15	0.05	<LOD	0.31	0.47
	Wheat bran	67	2.2	0.21	10	15
	Infant food	20	0.30	<LOD	1.2	1.5
15-acDON	All wheat samples	72	0.90	0.17	3.5	26
	Wheat flour	85	0.42	0.11	0.82	8.8
	Whole wheat flour	64	0.60	0.33	1.8	2.1
	Wheat kernels	72	1.0	0.46	4.5	6.1
	Semolina	46	0.10	<LOD	0.51	0.70
	Wheat bran	78	3.8	0.96	17	26
	Infant food	60	0.69	0.12	2.6	3.2
NIV	All wheat samples	67	6.8	1.8	24	96
	Wheat flour	56	4.3	1.8	12	77
	Whole wheat flour	91	13	9.5	41	62
	Wheat kernels	77	5.7	1.8	19	31
	Semolina	31	3.4	<LOD	17	35
	Wheat bran	89	23	14	68	96
	Infant food	40	2.1	<LOD	7.4	8.8
FX	All wheat samples	5.4	0.02	<LOD	0.10	0.93
	Wheat flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Whole wheat flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Wheat kernels	11	0.04	<LOD	0.18	0.93
	Semolina	7.7	0.01	<LOD	0.07	0.18
	Wheat bran	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Infant food	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Note: n.d. = not detectable.

contamination of 79% and a maximum level of $8.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ in rye kernels (Table 6). DAS, VOL and DacVOL were not detected and the levels of MAS and NEO were very low. Due to the low T-2 and HT-2 levels, the correlation between these two toxins was less evident than in wheat or oats (Figure 3).

However, all samples were contaminated with DON. The median contamination with this toxin was $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ and the 95th percentile value was $92 \mu\text{g kg}^{-1}$. The highest value of $288 \mu\text{g kg}^{-1}$ was found in rye kernels (Table 6). 3-acDON and 15-acDON were detected with mean levels of lower than $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ in

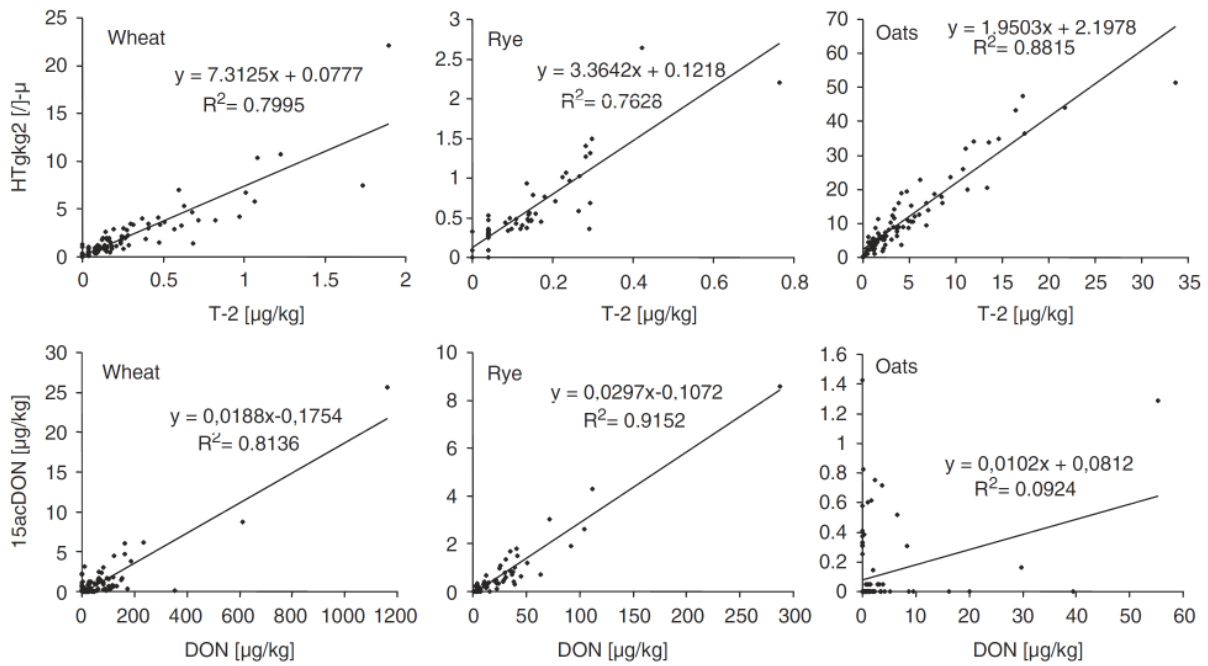


Figure 3. Correlation between T-2 and HT-2 levels (above) and DON and 15-acDON levels (below) in wheat samples ($n = 130$), rye samples ($n = 61$) and oat samples ($n = 98$).

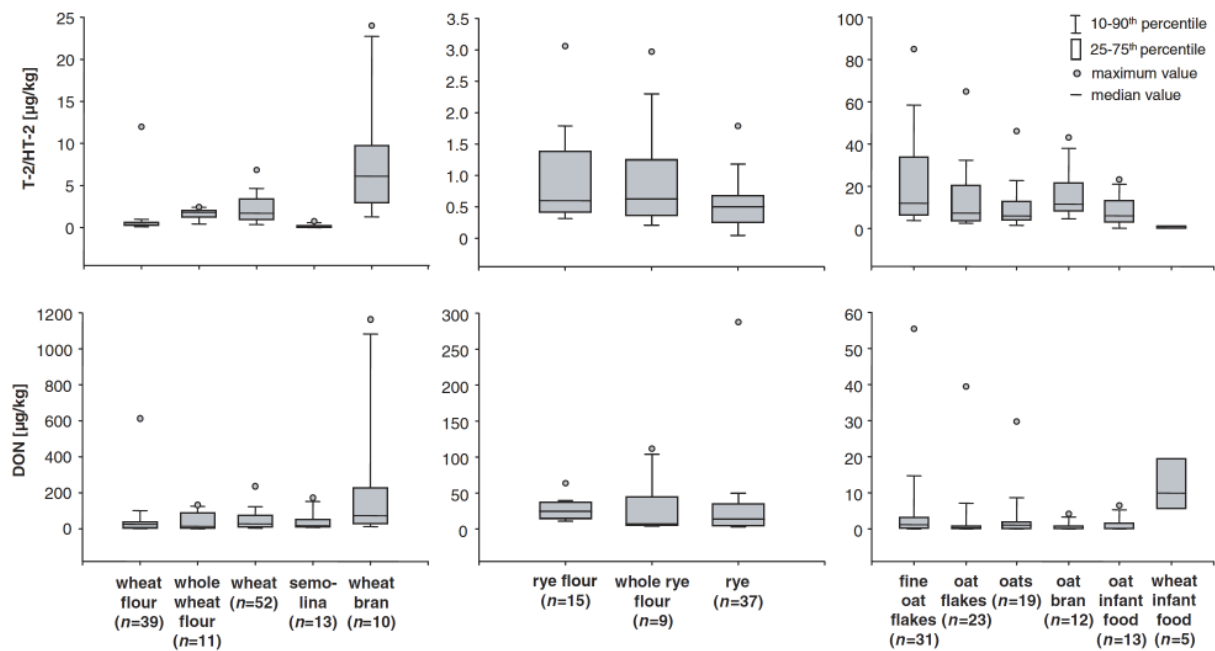


Figure 4. Comparison of contamination levels of T-2/HT-2 and DON in different food commodities of wheat, rye and oats.

10 C. Gottschalk et al.

Table 6. Rates and levels of contamination of different commodities of rye with the most relevant trichothecenes. All samples ($n=61$), rye flour ($n=15$), whole rye flour ($n=9$), rye kernels ($n=37$).

Analyte	Commodity	Contamination rate (%)	Mean ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	95th percentile ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Maximum value ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
T-2	All samples	87	0.13	0.11	0.30	0.77
	Rye flour	100	0.16	0.13	0.33	0.42
	Whole rye flour	100	0.22	0.18	0.59	0.77
	Rye kernels	78	0.10	0.04	0.29	0.30
HT-2	All samples	93	0.56	0.42	1.5	2.6
	Rye flour	100	0.73	0.45	1.8	2.6
	Whole rye flour	100	0.76	0.54	1.8	2.2
	Rye kernels	89	0.45	0.36	1.1	1.5
T-2 + HT-2	All samples	95	0.69	0.53	1.8	3.1
	Rye flour	100	0.89	0.57	2.1	3.1
	Whole rye flour	100	1.0	0.74	2.4	3.0
	Rye kernels	92	0.55	0.51	1.4	1.8
T-2 triol	All samples	4.7	0.01	<LOD	<LOD	0.25
	Rye flour	6.3	0.02	<LOD	0.06	0.25
	Whole rye flour	13	0.03	<LOD	0.16	0.25
	Rye kernels	2.9	0.01	<LOD	<LOD	0.25
T-2 tetraol	All samples	79	2.3	2.0	6.4	8.1
	Rye flour	88	2.5	2.3	6.3	6.4
	Whole rye flour	50	2.1	0.68	6.8	7.4
	Rye kernels	81	2.3	1.9	6.4	8.1
DAS	All samples	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Rye flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Whole rye flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Rye kernels	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MAS	All samples	87	0.05	0.02	0.15	0.31
	Rye flour	94	0.05	0.03	0.14	0.20
	Whole rye flour	88	0.07	0.02	0.24	0.31
	Rye kernels	84	0.04	0.02	0.13	0.18
NEO	All samples	15	0.01	<LOD	0.04	0.10
	Rye flour	19	0.01	<LOD	0.04	0.04
	Whole rye flour	38	0.02	<LOD	0.08	0.10
	Rye kernels	8.1	<LOD	<LOD	0.04	0.04
DON	All samples	100	28	15	92	288
	Rye flour	100	26	23	46	64
	Whole rye flour	100	32	6.5	105	112
	Rye kernels	100	28	14	79	288
3-acDON	All samples	59	0.39	0.21	1.6	5.0
	Rye flour	63	0.19	0.21	0.54	0.63
	Whole rye flour	50	0.49	0.11	2.0	2.4
	Rye kernels	59	0.45	0.21	1.6	5.0
15-acDON	All samples	80	0.73	0.35	2.6	8.6
	Rye flour	100	0.43	0.37	0.86	0.99
	Whole rye flour	63	0.88	0.20	3.5	4.3
	Rye kernels	76	0.84	0.35	2.7	8.6
NIV	All samples	3.3	0.06	<LOD	<LOD	1.8
	Rye flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Whole rye flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Rye kernels	5.4	0.10	<LOD	0.36	1.8
FX	All samples	1.6	0.01	<LOD	<LOD	0.18
	Rye flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Whole rye flour	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Rye kernels	2.7	<LOD	<LOD	<LOD	0.18

Note: n.d. = not detectable.

59 and 80% of the samples. It could be observed that the amounts of DON were about 30 times as high as the levels of 15-acDON (Figure 3). NIV and FX levels were almost all below the LOD. No type D trichothecenes were detected.

Trichothecene contamination of oat samples

All oat samples ($n=98$) were contaminated with T-2/HT-2 between 0.04 and $85 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 7). The median and 95th percentile value were 8.2 and $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. The highest levels were measured in fine

Table 7. Rates and levels of contamination of different commodities of oats with the most relevant trichothecenes. All samples ($n=98$), fine oat flakes ($n=31$), oat flakes ($n=23$), oat kernels ($n=19$), oat bran ($n=12$) and oat-containing infant food ($n=13$).

Analyte	Commodity	Contamination rate (%)	Mean ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	95th percentile ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Maximum value ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
T-2	All samples	100	4.2	2.2	15	34
	Fine oat flakes	100	6.7	3.6	20	34
	Oat flakes	100	3.8	1.8	11	17
	Oat kernels	100	2.5	1.5	7.3	12
	Oat bran	100	4.0	3.1	9.2	11
	Infant food	100	1.8	1.3	4.7	5.6
HT-2	All samples	99	10	6.0	35	51
	Fine oat flakes	100	14	8.3	44	51
	Oat flakes	100	9.6	5.4	24	48
	Oat kernels	100	7.6	4.4	18	34
	Oat bran	100	11	8.5	25	32
	Infant food	92	6.1	4.7	15	19
T-2 + HT-2	All samples	100	15	8.2	50	85
	Fine oat flakes	100	21	12	63	85
	Oat flakes	100	13	7.2	33	65
	Oat kernels	100	10	6.0	25	46
	Oat bran	100	15	12	34	43
	Infant food	100	7.9	6.0	20	23
T-2 triol	All samples	60	0.43	0.25	1.5	2.7
	Fine oat flakes	74	0.60	0.55	1.5	2.7
	Oat flakes	52	0.39	0.25	1.4	1.5
	Oat kernels	53	0.33	0.25	1.2	1.5
	Oat bran	58	0.38	0.25	1.2	1.5
	Infant food	54	0.26	0.25	0.85	1.3
T-2 tetraol	All samples	90	9.7	6.4	25	85
	Fine oat flakes	94	11	9.5	22	34
	Oat flakes	87	7.7	5.2	26	27
	Oat kernels	95	8.4	5.3	24	24
	Oat bran	100	11	10	26	26
	Infant food	69	12	3.0	44	85
DAS	All samples	60	0.05	0.04	0.17	0.38
	Fine oat flakes	71	0.08	0.04	0.19	0.38
	Oat flakes	65	0.04	0.04	0.12	0.17
	Oat kernels	47	0.04	< LOD	0.17	0.25
	Oat bran	75	0.04	0.04	0.08	0.12
	Infant food	31	0.03	< LOD	0.12	0.25
MAS	All samples	95	0.09	0.07	0.23	0.66
	Fine oat flakes	97	0.59	0.28	1.9	2.7
	Oat flakes	91	0.06	0.06	0.12	0.18
	Oat kernels	89	0.09	0.05	0.25	0.27
	Oat bran	100	0.08	0.06	0.16	0.17
	Infant food	92	0.07	0.06	0.20	0.21
NEO	All samples	92	0.37	0.22	1.4	2.7
	Fine oat flakes	97	0.59	0.28	1.9	2.7
	Oat flakes	96	0.33	0.14	1.1	1.4
	Oat kernels	79	0.22	0.13	0.64	0.9
	Oat bran	100	0.30	0.26	0.62	0.81
	Infant food	85	0.16	0.09	0.47	0.51
DON	All samples	74	2.8	0.53	11	55
	Fine oat flakes	87	4.3	1.2	18	55
	Oat flakes	70	2.6	0.30	8.9	39
	Oat kernels	84	2.9	1.1	11	30
	Oat bran	58	0.67	0.18	2.6	4.2
	Infant food	54	1.1	0.17	4.7	6.5
3-acDON	All samples	28	0.43	< LOD	2.1	8.2
	Fine oat flakes	48	0.97	< LOD	5.8	8.2
	Oat flakes	13	0.27	< LOD	1.9	3.6
	Oat kernels	16	0.19	< LOD	1.4	1.9
	Oat bran	25	0.12	< LOD	0.58	0.75
	Infant food	23	0.09	< LOD	0.44	0.78

(continued)

12 C. Gottschalk et al.

Table 7. Continued.

Analyte	Commodity	Contamination rate (%)	Mean ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	95th percentile ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Maximum value ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
15-acDON	All samples	28	0.11	<LOD	0.63	1.4
	Fine oat flakes	32	0.13	<LOD	0.77	1.3
	Oat flakes	8.7	0.03	<LOD	0.04	0.58
	Oat kernels	42	0.13	<LOD	0.62	0.75
	Oat bran	25	0.08	<LOD	0.35	0.38
	Infant food	31	0.20	<LOD	0.88	1.4
NIV	All samples	24	0.96	<LOD	6.1	17
	Fine oat flakes	39	2.0	<LOD	7.7	17
	Oat flakes	17	0.31	<LOD	1.8	1.8
	Oat kernels	26	1.1	<LOD	6.4	8.7
	Oat bran	17	0.30	<LOD	1.8	1.8
	Infant food	7.7	0.14	<LOD	0.72	1.8
FX	All samples	6.1	0.02	<LOD	0.18	0.53
	Fine oat flakes	6.4	0.01	<LOD	0.09	0.18
	Oat flakes	8.7	0.04	<LOD	0.41	0.53
	Oat kernels	5.3	0.01	<LOD	0.02	0.18
	Oat bran	n.d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Infant food	7.7	0.01	<LOD	0.07	0.18

Note: n.d. = not detectable.

oat flakes (Figure 4). All five samples (5.1%) which exceeded a level of $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ for the sum of T-2/HT-2 were part of this commodity. The T-2 levels in oats were about half the levels of HT-2 (Figure 3). Within the group of type A trichothecenes, T-2 tetraol also played a major role (rate of contamination 90%). The median level was $6.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ (95th percentile value: $25 \mu\text{g kg}^{-1}$). The highest value of $85 \mu\text{g kg}^{-1}$ was measured in a baby food sample (Table 7). For T-2 triol, NEO, DAS and MAS, levels of at most $2.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ were determined. VOL and DacVOL were not detected in any sample.

The contamination rate of DON was 74% of all oat samples. The median value was $0.53 \mu\text{g kg}^{-1}$ and the 95th percentile $11 \mu\text{g kg}^{-1}$. A maximum value of $55 \mu\text{g kg}^{-1}$ was determined in fine oat flakes (Table 7). DON levels of different commodities of oats are compared in Figure 4. 3-acDON and 15-acDON were measured each with a rate of contamination of 28% in all oat samples and with maximum levels of 8.2 and $1.4 \mu\text{g kg}^{-1}$. These levels were too low to observe a good correlation with DON (Figure 3). NIV occurred in 24% of the oat samples with a maximum level of $17 \mu\text{g kg}^{-1}$ found in fine oat flakes (Table 7). The highest contamination with FX (6.1% positive samples) was below $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Again, no type D trichothecenes were detected.

Trichothecene contamination of infant food

In 100% of the oat-containing baby food samples ($n=13$) and in 80% of the wheat-containing samples ($n=5$), T-2/HT-2 was detected. The median values were 6.0 and $0.36 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively (Figure 4).

The highest value of $23 \mu\text{g kg}^{-1}$ was found in an oat porridge powder which was concurrently contaminated with $85 \mu\text{g kg}^{-1}$ T-2 tetraol (Table 7). Otherwise, the levels of T-2 tetraol were low just like those of the other analytes. In Figure 4, the DON levels of oat and wheat-containing infant food are also compared to the other food commodities. DON was detected in 54 and 100% of these samples with median values of 0.17 and $9.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 5). The highest level of $24 \mu\text{g kg}^{-1}$ was detected in a semolina powder (Table 5). 3-acDON and 15-acDON were detected with levels below $3.2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Three samples contained NIV with maximal $8.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 5) and only one sample FX ($0.18 \mu\text{g kg}^{-1}$; Table 7).

Trichothecene contamination of feed oats

Oats of feed quality ($n=17$) were contaminated at a much higher level with type A and B trichothecenes due to the fact that the samples were husked oat kernels. The toxin levels are usually reduced about 90% by de-husking the grains (Scudamore et al. 2007). Maximum values of $531 \mu\text{g kg}^{-1}$ T-2/HT-2 and $654 \mu\text{g kg}^{-1}$ T-2 tetraol in the same sample were measured. The median/95th percentile values were $162/356 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $146/331 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively (rates of contamination 100%). T-2 tetraol again contributed considerably to the total type A trichothecene burden. All samples contained DAS (median/95th percentile value: $0.61/3.2 \mu\text{g kg}^{-1}$), MAS ($1.6/6.3 \mu\text{g kg}^{-1}$), and NEO ($4.7/17 \mu\text{g kg}^{-1}$). For NEO, comparatively high values up to $28 \mu\text{g kg}^{-1}$ were determined. Thereby, a strong correlation was also observed between the levels of T-2 and NEO.

In this matrix, the levels were high enough to not be influenced by the LOQ of the method. The NEO level was about 15% of the one of T-2 ($r^2=0.9496$). No VOL or DacVOL were measured.

All samples were concurrently contaminated with DON (median/95th percentile value: 58/678 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and NIV (57/189 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Two samples had exceptionally high levels of 2400 and 490 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The contamination rates of 3-acDON, 15-acDON and FX were 53, 24 and 29%, respectively. The levels of 3-acDON (median/95th percentile value: 0.76/32 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 15-acDON (<LOD/3.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$), and FX (<LOD/3.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were still low, although they remarkably differed from those of the food samples. Only the sample with the highest DON-contamination contained a mentionable amount of 99 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of 3-acDON. However, no type D trichothecenes were detected.

Discussion

Type A trichothecenes

Oats and oat products had the highest levels of contamination with type A trichothecenes (Table 7). However, the comparatively low contamination of wheat should not be disregarded owing to its much higher intake. In SCOOP task 3.2.10 (2003), wheat was identified as the predominant source of T-2/HT-2, but also of DON and NIV intake. As reported in the SCOOP study, oat samples were most frequently contaminated with HT-2 (rate of contamination 41%), followed by maize (24%), rye (17%), and wheat (12%). The highest contamination rate with T-2 (28%) was found in maize (oats 16%, wheat and rye 21%, each). In this project, however, 100% of the oat samples, 94% of the wheat samples and 95% of the rye samples contained T-2/HT-2, which can be traced back to the much lower detection limits of this method. Thus, also the rates of contamination of T-2 triol, DAS, MAS and NEO were much higher (Tables 5–7) in this study. However, the concentrations of these analytes were all below the LODs of the methods applied in the SCOOP study (2003), where only 1–6% of the samples were positive for these analytes. The LODs for type A trichothecenes in wheat, rye or oats were between 2 and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in dependence of the analyte and the contributing laboratory. Like in this study, VOL was not detected, but no samples were analyzed for T-2 tetraol or DacVOL. However, data on the occurrence of T-2 tetraol were provided by Klötzel et al. (2005) and Schollenberger et al. (2006). Both reported high levels of this analyte in oats, which were even higher than T-2 or HT-2, also supporting our results.

In comparison to the concentrations of type A trichothecenes found in this study, the levels reported

in SCOOP (2003) were much higher. T-2 levels of wheat were between 2 and 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$, HT-2 levels between 3 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In rye, T-2 values ranged between 10 and 190 $\mu\text{g kg}^{-1}$. HT-2 values of between 10 and 70 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were determined. T-2 levels in oats ranged between 10 and 550 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and HT-2 levels between 10 and 1150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SCOOP 2003). The values of the few T-2 triol, DAS, MAS and NEO positive samples were between 30 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. These higher levels may be a result of differing origins or crop years. It also has to be considered that the samples analyzed here were all at least cleaned and de-hulled cereals intended for human consumption. It has been shown that raw cereal kernels contain a 10-fold higher toxin amount than de-hulled kernels (Scudamore et al. 2007). Furthermore, Northern European countries contributed results to the SCOOP study where usually the highest T-2/HT-2 levels are determined (Langseth and Rundberget 1999, Pettersson and Börjesson 2006).

The correlations between T-2 and HT-2 in the different cereal types gave interesting results. While in wheat the level of HT-2 was about seven-fold as high as the T-2 level, HT-2 levels in oats were only about twice as high as those of T-2. The contamination levels of rye were however too low to be able to make proper comparisons (Figure 3). These different levels may be due to the ability of the plant to metabolize T-2 to HT-2, which has been described for species of *Baccharis* (Mirocha et al. 1988). The synthesis of deacetylases may be plant-specific. In this context, also deacetylases originating from bacteria of the plant can play a role in metabolizing processes (Beeton and Bull 1989, Ueno et al. 1983). Differences in the correlations between T-2 and HT-2 levels may be due to differing bacterial flora of each plant. However, it is questionable whether these processes could lead to such considerable correlations. It seems more likely that the different cereal types are infected by different *Fusarium* species or strains which possess characteristic metabolite production abilities.

Nonetheless, oat products had the highest levels of contamination with T-2/HT-2 as well as T-2 tetraol. It should be noticed that the predominantly consumed oat products, fine oat flakes, were the food commodity with the highest levels (Figure 4). Especially infants and children have a high intake of these products by the consumption of muesli (see also “Dietary intake estimation”). This should be of concern to official food control authorities and for future legislation.

Type B trichothecenes

All wheat and rye samples were contaminated with DON, while 74% of the oat samples contained this analyte. The mean contamination level of rye

14 C. Gottschalk et al.

($28 \mu\text{g kg}^{-1}$) was about half the level of wheat ($57 \mu\text{g kg}^{-1}$), while the mean DON burden of oats was comparably low ($2.8 \mu\text{g kg}^{-1}$; Tables 5–7). In the SCOOP study (2003), DON was detected in only 61% of the wheat samples (mean level of all contributing countries: $205 \mu\text{g kg}^{-1}$), in 41% of the rye samples ($42 \mu\text{g kg}^{-1}$) and in 33% of the oat samples ($95 \mu\text{g kg}^{-1}$). The rates of contamination as well as the toxin levels were influenced by the LODs of the different methods applied in the SCOOP study (2.0 – $220 \mu\text{g kg}^{-1}$). In wheat, the levels of DON ranged between 2.0 and $50,000 \mu\text{g kg}^{-1}$, between 2.0 and $595 \mu\text{g kg}^{-1}$ in rye, and between 2.0 and $5004 \mu\text{g kg}^{-1}$ in oats. Engelhardt et al. (2006) reported mean DON levels in wheat of $138 \mu\text{g kg}^{-1}$. Mean levels in wheat and oats reported by Biselli and Hummert (2005) were 230 and $250 \mu\text{g kg}^{-1}$. Similar results were shown by Schollenberger et al. (2002). The levels found in this study were much lower, which may be a result of the same reasons discussed above (Scudamore et al. 2007).

In the SCOOP study (2003), only 8.0% of the wheat samples, less than 1.0% of the rye samples and 6.0% of the oat samples contained 3-acDON, but at least 20% of all samples 15-acDON. Much higher rates of contamination were determined in this study (Tables 5–7). It was shown that the levels of the acetyl metabolites of DON were only about 2–3% as high as the DON-levels of wheat and rye. Due to the low DON levels in oats, no correlation could be observed in this matrix (Figure 3). Basically, the 15-acDON levels were higher than those of 3-acDON. This resulted in more positive samples which exceeded the LOD. These results are in accordance with Klötzel et al. (2005).

For NIV, rates of contamination of 14% of wheat (values between 2.0 and $440 \mu\text{g kg}^{-1}$), 5.0% of rye (values between 2.0 and $48 \mu\text{g kg}^{-1}$), and 21% of oats (values between 2.0 and $1860 \mu\text{g kg}^{-1}$) were reported in SCOOP data (2003). In spite of the more sensitive method applied here, the contamination rates of rye and oats from SCOOP data were similar to our results (Tables 5–7). However, 67% of the wheat samples were found to be NIV-positive, but with much lower contamination levels as a result of the above mentioned reasons.

The rates and levels of contamination with FX were extremely low in this study (Tables 5–7). Schollenberger et al. (1999, 2002) and Klötzel et al. (2005) also reported no positive cereal-based food samples, wheat or oat samples (LODs: 6 and $1.3 \mu\text{g kg}^{-1}$). However, 10% of the wheat samples from SCOOP contained FX between 3.3 and $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Type D trichothecenes

To our knowledge, this was the first measurement of type D trichothecenes in a multitude of representative

cereal food samples ($n=289$) since 1980, when a much less sensitive method was applied (Stack and Eppley 1980). Thus, it was necessary to develop a sensitive LC–MS/MS method to provide more up-to-date occurrence data. No samples contained satratoxin G or H, roridin A or verrucaridin A above their LODs. Actually, it can be concluded that *Stachybotrys* spp. and *Myrothecium* spp. metabolites did not represent a risk to food security, at least as regarding wheat, rye and oat products. The number of horse feed samples (raw oats, $n=17$) was too low to draw proper conclusions, but no sample contained macrocyclic trichothecenes. However, results of Kluwe (2006) revealed that stachybotryotoxicosis still is a risk in horse feeding. At least 20% of 100 hay and straw samples contained *Stachybotrys* spp. Altogether, 32 strains have been isolated and were tested for their toxinogenicity. More than 35% of these strains possessed the tri5-gene and actually produced satratoxin G and H as examined by LC–MS/MS (Kluwe 2006).

Estimation of dietary intake

The toxicity of DON, NIV, and T-2/HT-2 was evaluated by the Scientific Committee on Food (SCF) in a set of opinions (SCF 1999–2002). In a group evaluation of these four analytes, the Committee concluded that combined or synergistic effects were not probable, although currently available data on this matter was limited. Hence, the Committee confirmed the single TDI-values or temporary TDI-values (t-TDI) for each toxin as follows:

- DON: $\text{TDI} = 1 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight (bw) day^{-1} ;
- NIV: $\text{t-TDI} = 0.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ bw day^{-1} ;
- T-2/HT-2: $\text{t-TDI} = 0.06 \mu\text{g kg}^{-1}$ bw day^{-1} .

In the following, intake estimations for DON, NIV and T-2/HT-2 were conducted for young children and infants. These are the consumer groups with the highest risk, as they have an exceptionally high intake in relation to their body weight. Hereby, data on the average consumption of wheat flour, rye flour, oat flakes and oat-containing baby food were used (Table 8). The average body weight of 9-month-old infants and 2–5-year-old children were quoted with 8.95 kg and 16.15 kg (Kersting et al. 1998, Banasiak et al. 2005). The calculations were conducted for a mean case scenario (average consumption \times median toxin concentration) and a bad case scenario (average consumption \times 95th percentile value of toxin concentration). The corresponding levels of contamination can be gleaned from Tables 5–7.

The daily toxin intake by average consumption of selected food commodities and the percentage of

Table 8. Estimated intake of DON, NIV and T-2/HT-2 by average consumption of selected food commodities by 2–5-year-old children* and 9-month-old infants.**

Commodity	Average consumption (g day ⁻¹)	Estimated toxin intake (ng day ⁻¹) [% TDI]					
		DON		NIV		T-2/HT-2	
		Mean case	Bad case	Mean case	Bad case	Mean case	Bad case
Wheat flour	65.2*	1630 [10]	7172 [44]	117 [1.0]	782 [6.9]	22 [2.3]	72 [7.4]
Rye flour	12.3*	283 [1.8]	566 [3.5]	0 [0]	0 [0]	7.0 [0.72]	26 [2.7]
Fine oat flakes	3.1*	3.7 [0.02]	56 [0.35]	0 [0]	24 [0.21]	37 [3.8]	195 [20]
Oat-containing infant food	30.1**	5.1 [0.06]	141 [1.6]	0 [0]	22 [0.35]	181 [34]	602 [112]

Notes: *Banasiak et al. 2005; **Kersting et al. 1998.

the corresponding TDI values is shown in Table 8. In the SCOOP study (2003), wheat was identified as the major source of T-2/HT-2 as well as DON and NIV intake. As expected, this was re-confirmed at least with regard to DON and NIV. However, the consumption of oat flakes was shown to play a major role in T-2/HT-2 exposure in this study. The contribution of rye, however, seemed to be negligible. Assuming the mean case scenario, the total T-2/HT-2 intake by the daily ingestion of wheat and rye flour as well as oat flakes barely corresponded to 10% of the t-TDI, whereas the intake by baby food was more than 30% of the t-TDI (Table 8). It must be pointed out that the number of baby food samples examined in this study was too small to justify proper conclusions. However, the T-2/HT-2 levels of oat-containing baby food ($n=13$) indicated a possible exceedance of the t-TDI in the sub-population of infants giving cause for further study. Furthermore, it should be mentioned that not only T-2/HT-2 primarily accounted for the total type A trichothecene burden but also T-2 tetraol, although this analyte possesses a lower toxicity.

The intake of DON mostly depended on the consumption of wheat. In spite of its high consumption, the contribution to the TDI was only 10% assuming the median contamination level. In the bad case scenario, the DON intake amounted to 44% of the TDI (Table 8). The total DON intake by the daily consumed wheat, rye and oat commodities was slightly increased by the contamination of rye flour, while oat flakes as a source for DON-intake were negligible. The contamination of baby food was considerably lower, which resulted in a very low exposure even assuming the bad case scenario.

The exposure to NIV played a minor role after consumption of the cereals examined in this study. Even in the worse-case scenario, only about 7% of the t-TDI for NIV were reached. Rye, oats, and baby food did not or hardly contributed to a NIV-exposure (Table 8).

In conclusion, the risk of exceeding the TDI values could be regarded as low with respect to average consumption and toxin concentrations, in comparison

with data of the SCOOP report (2003). Therein, the percentage of the TDI by the DON intake of infants ranged between 11 and 96% and between 27 and 560% for the T-2/HT-2 intake, subject to the calculations of the contributing countries. However, infants represented the sub-population with the highest risk to exceed the t-TDI of T-2/HT-2 also in this study. Thus, the setting of a maximum level may be appropriate particularly for baby food or special commodities like oat flakes. It should be noted that wheat, for example, did not contain only DON but also T-2/HT-2 and that the simultaneous occurrence of these toxins leads to a higher total mycotoxin ingestion. Hence, the consideration of a group-TDI for trichothecenes may be useful for a proper risk assessment (Pronk et al. 2002).

Acknowledgements

The authors wish to thank the Bavarian State Ministry of the Environment, Public Health and Consumer Protection as well as the H. Wilhelm Schaumann Foundation for the financial support. Also thanks to the teams of the mycotoxin laboratories for their unhesitant help and labour in grinding, homogenization and preparation of the samples and to Stefan Asam and Michael Rychlik for conducting comparison measurements.

References

- Banasiak U, Hesecker H, Sieke C, Sommerfeld C, Vohmann C. 2005. Abschätzung der Aufnahme von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in der Nahrung mit neuen Verzehrsmengen für Kinder. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz. 48:84–98.
- Beeton S, Bull AT. 1989. Biotransformation and detoxification of T-2 toxin by soil and freshwater bacteria. Appl Environ Microbiol. 55:190–197.
- Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 16:497–516.
- Berthiller F, Schuhmacher R, Buttinger G, Krska R. 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high

16 C. Gottschalk et al.

- performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1062:209–216.
- Biselli S, Hummert C. 2005. Development of a multi-component method for *Fusarium* toxins using LC–MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. *Food Add Contam*. 22:752–760.
- Deutsches Institut für Normung. 1994. DIN 32645 Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin, Germany.
- Engelhardt G, Barthel J, Sparrer D. 2006. *Fusarium* mycotoxins and ochratoxin A in cereals and cereal products: results from the Bavarian Health and Food Safety Authority in 2004. *Mol Nutr Food Res*. 50:401–405.
- European Commission. Directorate-General Health and Consumer Protection. 1999–2002. Scientific Committee on Food (SCF): Opinions of the SCF on *Fusarium* toxins. Part 1–6. Available from: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/fusarium_en.htm
- European Commission. Directorate-General Health and Consumer Protection. 2003. Scientific Cooperation: SCOOP Task 3.2.10: Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by population of EU Member States. Available from: <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>
- European Commission. 2002. Commission Decision (EC) No 657/2002 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Union*. L221:8–36.
- European Commission. 2006. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off J Eur Union* L70:12–34.
- European Commission. 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union* L364:5–24.
- European Commission. 2007. Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Off J Eur Union* L255:14–17.
- Gentili A, Caretti F, D’Ascenzo G, Mainero Rocca L, Marchese S, Materazzi S, Perret D. 2007. Simultaneous determination of trichothecenes A, B, and D in maize food products by LC–MS–MS. *Chromatographia*. 66:669–676.
- Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. 2008. Detection of satratoxin G and H in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia*. 166:103–107.
- Jarvis BB, Lee Y-W, Comezoglu SN, Yatawara CS. 1986. Trichothecenes produced by *Stachybotrys atra* from Eastern Europe. *Appl Environ Microbiol*. 51:915–918.
- Jarvis BB, Sorenson WG, Hintikka EL, Nikulin M, Zhou Y, Jiang J, Wang S, Hinkley S, Etzel RA, Dearborn D. 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.
- Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. 1996. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health*. 68:207–218.
- Kersting M, Alexy U, Sichert-Hellert W, Manz F, Schöch G. 1998. Measured consumption of commercial infant food products in German infants: results from the DONALD study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 27:547–552.
- Klötzel M, Gutsche B, Lauber U, Humpf H-U. 2005. Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 53:8904–8910.
- Kluwe H. 2006. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Stachybotrys* spp. in Heu- und Strohproben aus Pferdeställen. Dissertation. Munich, Germany: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Krska R, Baumgartner S, Josephs R. 2001. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem*. 371:285–299.
- Lagana A, Curini R, D’Ascenzo G, De Leva I, Faberi A, Pastorini E. 2003. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification and determination of trichothecenes in maize. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 17:1037–1043.
- Langseth W, Rundberget T. 1999. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*. 147:157–165.
- Mirocha CJ, Abbas HK, Treeful L, Bean G. 1988. T-2 Toxin and diacetoxyscirpenol metabolism by *Baccharis* spp. *Appl Environ Microbiol*. 54:2277–2280.
- Pettersson H, Börjesson T. 2006. T-2 and HT-2 toxins in oats. Presented at Proceedings of the 28th Mycotoxin Workshop, May 29–31, Bydgoszcz, Poland, 2006.
- Pronk MEJ, Schothorst RC, Egmond HP. 2002. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes (Report No 388802024/2002). Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment.
- Schollenberger M, Suchy S, Jara HT, Drochner W, Müller H-M. 1999. A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*. 147:49–57.
- Schollenberger M, Jara HT, Suchy S, Drochner W, Müller H-M. 2002. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. *Int J Food Microbiol*. 72:85–89.
- Schollenberger M, Müller H-M, Rühle M, Suchy S, Plank S, Drochner W. 2006. Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia*. 161:43–52.
- Scudamore KA, Baillie H, Patel S, Edwards SG. 2007. Occurrence and fate of *Fusarium* mycotoxins during commercial processing of oats in the UK. *Food Addit Contam*. 24:1374–1385.

- Stack ME, Eppley RM. 1980. High pressure chromatographic determination of satratoxins G and H in cereal grains. *J Assoc Off Anal Chem.* 63:1278–1281.
- Stecher G, Jarukamjorn K, Zaborski P, Bakry R, Huck CW, Bonn GK. 2007. Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. *Talanta.* 73:251–257.
- Thrane U, Adler A, Clasen P-E, Galvano F, Langseth W, Lew H, Logrieco A, Nielsen KF, Ritieni A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int J Food Microbiol.* 95:257–266.
- Torp M, Nirenberg HI. 2004. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *Int J Food Microbiol.* 95:247–256.
- Ueno Y. 1983. *Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects.* Amsterdam: Elsevier.
- Ueno Y, Nakayama K, Ishii K, Tashiro F, Minoda Y, Omori T, Komagata K. 1983. Metabolism of T-2 toxin in *Curtobacterium* sp. strain 114-2. *Appl Environ Microbiol.* 46:120–127.
- World Health Organisation (WHO). 1990. Selected mycotoxins: Ochratoxins, trichothecenes, ergot. *Environmental Health Criteria* no. 105. Geneva: WHO.

Publikation 3:

Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotoxin Research*. 2006;22:189-192.

Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS

C. Gottschalk, J. Bauer, K. Meyer

TU München, Chair of Animal Hygiene, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany

Abstract

Stachybotrys occurring in mouldy indoor environments is associated with the so called “sick building syndrome” in humans or cases of idiopathic pulmonary hemorrhages. Samples of mouldy materials from indoor environments (n=15) were analysed for the occurrence of this fungus and its secondary metabolites by a sensitive LC-MS/MS method. In four samples, *Stachybotrys* and macrocyclic trichothecenes have been detected. Maximum values for Satratoxin G and H in wallpaper were determined with 9.7 µg/cm² and 12.0 µg/cm², respectively.

Keywords: macrocyclic trichothecenes, *Stachybotrys*, Satratoxin

Introduction

Macrocyclic trichothecenes produced by *Stachybotrys* species are highly toxic compounds associated with the so called “sick building syndrome” in humans. As several case control studies have shown, the occurrence of *Stachybotrys* in indoor environments could be related to headaches, fatigue, nausea, vomiting, hemorrhages, depression, sleep disturbances, anxiety, vertigo, and amnesia. Also cases of pulmonary hemosiderosis in infants have been related to *Stachybotrys* growth (1, 2). In 1938, this mould was first identified as etiologic agent of stachybotryotoxicosis, a severe disease of horses, which has been caused by ingestion of mouldy straw. Later, macrocyclic trichothecenes were supposed to be the reason of this disease (3). Because of its high cellulolytic potential, *S. chartarum*, which is mainly responsible for toxin production, also grows on humid cellulose-containing materials like wallpaper or gypsum board, e.g. after water damages (4). In this study a sensitive LC-MS/MS method has been developed to determine Satratoxins and other macrocyclic trichothecenes in these matrices.

Materials and Methods

Materials

15 samples were taken from mouldy indoor materials like wallpaper (n=3), wall (n=10) or gypsum board (n=2). Standard substances of Roridin A and Verrucaric acid were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany). Standards of Satratoxin G and H were kindly provided by Prof. Gareis (BfEL Kulmbach, Germany). Acetonitrile and methanol (HPLC-grade) were purchased from J.T. Baker (Griesheim, Germany). Water was purified by a milli-Q water purification system (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany).

Mycological examination

For mould differentiation, smears of the mouldy area were plated on Sabouraud agar and incubated overnight at 37 °C. After an incubation time of one week at room temperature, micro-morphological characterisation was carried out by tape preparations and staining with lactophenol blue solution at 1000-fold magnification.

Sample preparation and recovery experiments

About 15 cm² wallpaper, wall or gypsum board was reduced to small pieces and extracted with 10 ml acetonitrile/water 84/16 (v/v) by shaking for 1 h using a horizontal shaker. The extract was centrifuged for 5 min at 5000 rpm. For analysis, an aliquot was diluted 1:5 with water and filtered through a 0.45 µm PTFE syringe filter (Supelco, Deisenhofen, Germany). For

The MS/MS experiments were carried out in positive electrospray ionisation mode with an ion spray voltage of 4000 V and a source temperature of 300 °C. The nebulizer gas flow was set at 50 psi and the heating gas at 30 psi. As there were no standards available for Roridin E, Roridin L-2, Satratoxin F and Verrucaridin J, probable mass transitions were assumed for these toxins. All substances showed best sensitivity as adduct-ions of ammonium $[M+NH_4]^+$. The MRM-transitions, declustering potentials and collision energies used as well as the retention times of the toxins are shown in Table 1.

Results and Discussion

Mould characterisation

Stachybotrys and its toxins could be detected on three wallpaper samples and one gypsum board sample. Other moulds like *Aspergillus* and *Penicillium* were also detected frequently (Table 2). From one wall sample no mould growth could be observed.

LC-MS/MS analysis

Spiking experiments with Satratoxin G and H at a level of 1 µg/cm² (n=3) resulted in recovery rates of 92.9±0.2% (mean±RSD) for Satratoxin G and 107.4±2.1% for Satratoxin H.

All *Stachybotrys* positive samples (n=4) also contained macrocyclic trichothecenes. In the other samples none of the toxins analysed could be identified. From two wallpaper samples different pieces have been examined. The analysis gave varying results (Table 3). This indicates an unequal distribution of the toxins in the mouldy material. Satratoxin G and H showed maximum levels of 9.7 µg/cm² and 12.0 µg/cm², respectively. Furthermore, substances with defined retention times and fragmentation patterns corresponding to those supposed for Roridin E, Roridin L-2, Satratoxin F and Verrucaridin J could be identified (Figure 1). A co-occurrence of these toxins with Satratoxin G and H has been described formerly by Andersen *et al.* (5). However, a definite identification by the given methods was not possible due to lacking standard substances. Roridin A and Verrucaridin A were not detected.

It can be concluded that the occurrence of Satratoxins in such high amounts implicates a severe contamination of indoor environments. However, these toxins were determined in indoor materials and not in indoor air or dust. Thus, a direct exposure of humans to these toxins is not yet proven. More information about the possible health risk will be gained in a further study, examining dust and/or air from the locations where the samples have been drawn.

Table 3. Results of LC-MS/MS analysis for 8 macrocyclic trichothecenes (ng/cm²)

Sample	Roridin A	Roridin E*	Roridin L-2*	Satratoxin F*	Satratoxin G	Satratoxin H	Verrucaridin A	Verrucaridin J*
Gypsum board 1	-	-	-	-	18	22	-	-
Wallpaper 1a**	-	-	-	-	27	20	-	-
Wallpaper 1b**	-	+	-	-	740	740	-	-
Wallpaper 2a**	-	+++	-	-	1560	3260	-	-
Wallpaper 2b**	-	++	++	+	9650	12000	-	++
Wallpaper 3	-	+++	++	++	260	360	-	++

* Quantitation not possible lacking standard substances ** a/b: Different spots of one sampled area

Mycotoxin Research Vol. 22, No. 3 (2006), 189-192

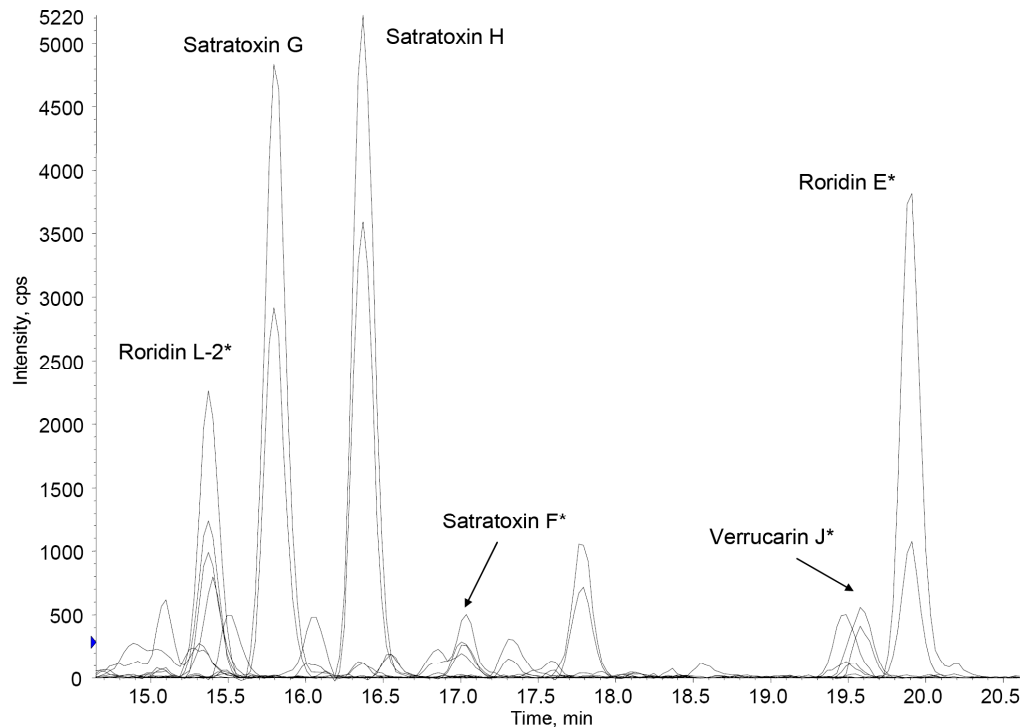


Figure 1. Extracted ion chromatogram (LC-MS/MS) of a wallpaper-extract

References

- Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P (1996) Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health* 68: 207-218
- Jarvis BB, Sorenson WG, Hintikka EL, Nikulin M, Zhou Y, Jiang J, Wang S, Hinkley S, Etzel RA, Dearborn D (1998) Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memmoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Appl Env Microb* 64: 3620-3625
- Jarvis BB, Lee Y-W, Comezoglu SN, Yatawara CS (1986) Trichothecenes produced by *Stachybotrys atra* from Eastern Europe. *Appl Env Microb* 51: 915-918
- Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF (1999) Microfungal contamination of damp buildings – examples of risk constructions and risk materials. *Env Health Persp* 107 (Supplement 3): 505-508
- Andersen B, Nielsen KF, Thrane U, Szaro T, Taylor JW, Jarvis BB (2003) Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* 95 (6): 1227-1238

Publikation 4:

Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Detection of satratoxin G and H in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia*. 2008;166;103-107.

Mycopathologia (2008) 166:103–107
DOI 10.1007/s11046-008-9126-z

Detection of Satratoxin G and H in Indoor Air from a Water-Damaged Building

Christoph Gottschalk · Johann Bauer ·
Karsten Meyer

Received: 21 February 2008 / Accepted: 17 April 2008 / Published online: 29 April 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract The occurrence of *Stachybotrys chartarum* in indoor environments has been linked to adverse health effects as well as few cases of pulmonary haemorrhages in humans. Although the highly toxic secondary metabolites of this fungus, like satratoxin G and H, were frequently claimed with outbreaks of such diseases, these toxins have hardly been identified in the air of naturally contaminated indoor environments. Herein, a case of a LC–MS/MS-confirmed occurrence of airborne *S. chartarum*-toxins in a water-damaged dwelling is reported. Satratoxin G (0.25 ng/m³) and satratoxin H (0.43 ng/m³) were detected. This provides further evidence that *Stachybotrys*-toxins can be transferred from mouldy indoor materials into air, which could be a factor in the aetiology of health symptoms related to the sick building syndrome.

Keywords Indoor air · LC–MS/MS · Macrocytic trichothecenes · Satratoxin · Sick building syndrome · *Stachybotrys chartarum*

Abbreviations

MVOCs Microbial volatile organic compounds
SBS Sick building syndrome
SG Satratoxin G
SH Satratoxin H
VOCs Volatile organic compounds

Introduction

Macrocytic trichothecenes produced by *Stachybotrys chartarum* are highly toxic compounds associated with the so-called ‘sick building syndrome’ (SBS) in humans. Several case control studies have shown that the occurrence of *Stachybotrys chartarum* in indoor environments could be related to headaches, fatigue, nausea, vomiting, haemorrhage, depression, sleep disturbances, anxiety, vertigo, memory-loss and even cases of idiopathic pulmonary haemosiderosis suffered by children from these environments [1–5]. *S. chartarum*, a well-known producer of macrocytic trichothecenes [6], can grow and produce mycotoxins on humid cellulose-containing materials like wallpaper or gypsum board (e.g. after water damages) [1, 7–10], while optimal growth conditions for this mold are given at a water activity value of 0.98 [11]. Elidemir et al. [12] reported the first case of an isolation of *Stachybotrys chartarum* in the lung of a child suffering from pulmonary haemosiderosis. Recently, albumin-adducts of satratoxin G were discussed to serve as biomarkers for an exposure to *Stachybotrys chartarum*. They were observed in sera of rats and cats after exposition to this fungus [13, 14]. However, a causal relationship between *S. chartarum* and illnesses observed in sick buildings is not yet proven, since there are a variety of other pollutants like the wide range of VOCs, MVOCs, endotoxins, respirable dusts and other compounds in the indoor environment, which also can be a reason for adverse health effects [15, 16]. Findings of Johanning

C. Gottschalk (✉) · J. Bauer · K. Meyer
TU München, Institute of Animal Hygiene,
Weihenstephaner Berg 3, Freising 85354, Germany
e-mail: christoph.gottschalk@wzw.tum.de

et al. [17] and Bloom et al. [18] gave evidence that these toxins can become airborne. To our knowledge, the case described here is the first report of a LC–MS/MS-confirmed occurrence of airborne satratoxins in a naturally contaminated dwelling.

Materials and Methods

Sampling

Sampling was conducted in a dwelling with water damage and well-known occurrence of *Stachybotrys* and its toxins [10]. Satratoxin G (SG) and satratoxin H (SH) had previously been found in the mouldy wallpaper of this dwelling with 9.7 and 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. For indoor air sampling, a MD 8 air sampler (Sartorius, Goettingen, Germany) was used. Air was filtered through a polycarbonate membrane filter with a pore size of 0.8 μm (Millipore, Schwalbach, Germany) during 15 h at a flow rate of 5 m^3/h .

Chemicals and Reagents

Standards of satratoxin G and H were kindly provided by Prof. Gareis (Max Rubner-Institut, Kulmbach, Germany). Acetonitrile and methanol (HPLC-grade) were purchased from J.T. Baker (Griesheim, Germany). LC–MS quality ammonium formate (Fluka, Deisenhofen, Germany) and water purified in a milli-Q water purification system (Millipore, Schwalbach, Germany) were used.

Sample Preparation and Recovery Experiments

The polycarbonate filter membrane (80 mm diameter) was cut into small pieces and extracted with 10 ml acetonitrile/deionised water 84/16 (v/v) on a horizontal shaker for 30 min. The extract was centrifuged for 10 min at 6,000g and cleaned by passing 5 ml through a Bond Elut Mycotoxin[®] column (Varian, Darmstadt, Germany). Three millilitres of filtrate was evaporated under a gentle stream of nitrogen at 40°C (Barkey, Leopoldshöhe, Germany). Residues were dissolved in 500 μl methanol/deionised water 1/9 (v/v) and filtered through a 0.45 μm PTFE syringe filter (Supelco, Deisenhofen, Germany).

For testing the recovery of SG and SH from polycarbonate filters, blank membranes (80 mm diameter;

$n = 3$) were contaminated with 50 ng of each toxin and extracted according to the method above. Furthermore, a blank filter membrane and an air sample from a *Stachybotrys*-free indoor environment were used as negative controls.

LC–MS/MS Analysis

The LC–MS/MS measurements were done with a HPLC apparatus Series 200 (Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany) and an API 3200 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). A Gemini 150 \times 2 mm, 5 μm (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) was used as the analytical column. The binary linear gradient consisted of eluent A (deionised water + 5 mM ammonium formate) and eluent B (methanol + 5 mM ammonium formate) with a flow rate of 400 $\mu\text{l}/\text{min}$: 0 min 10% B, 8 min 100% B, 12 min 100% B, 12.5 min 10% B, 15 min 10% B. The column oven temperature was maintained at 40°C and the injection volume was 20 μl .

The MS/MS experiments were carried out in positive electrospray ionisation mode (ESI+) with an ion spray voltage (ISV) of 4,000 V and a source temperature of 300°C. The nebulizer gas flow was set at 50 psi, the heating gas at 30 psi and the curtain gas at 20 psi. The CAD (collisionally activated dissociation) nitrogen gas flow was used in high mode.

The toxins were identified in multiple reaction-monitoring mode (MRM). SG and SH showed the best sensitivity as adduct-ions of ammonium $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. The fragment ions were selected from mass spectra of product ion scans of SG and SH which are shown in Figs. 1 and 2, respectively. The fragment ion m/z 249.1 indicated the cleavage of the macrocyclic ring between C4 and C15 of the molecule. It was the most intensive fragment for SG, but also occurred after fragmentation of SH. Nielsen et al. [19] also described this product ion after fragmentation of another trichothecene, trichoverol A. Another fragment ion of SG and SH, m/z 231.1, which is also a common product of all trichothecenes [20], resulted from a further loss of H_2O . Other major fragments of SG, like m/z 133.2 or 105.2, could not be interpreted. For SH, the product ion m/z 245.2 was the most sensitive and selective fragment, but with unknown structure.

For the identification of SG, the following optimised parameters and two mass transitions (one

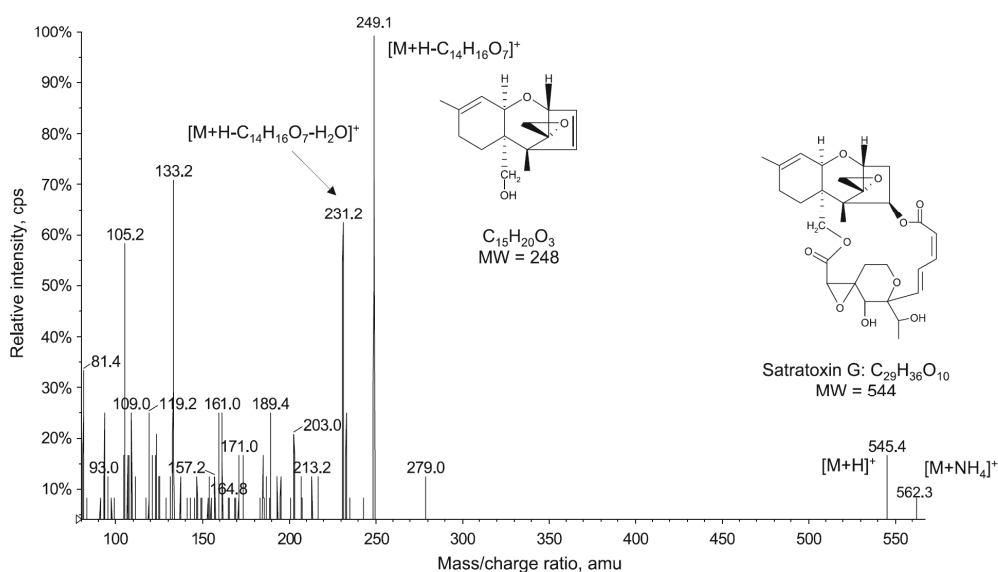


Fig. 1 Product ion spectrum (LC-MS/MS) of SG based on the precursor ion $[M+NH_4]^+$. Ionisation ESI+, ISV 4,000 V, DP 21 V

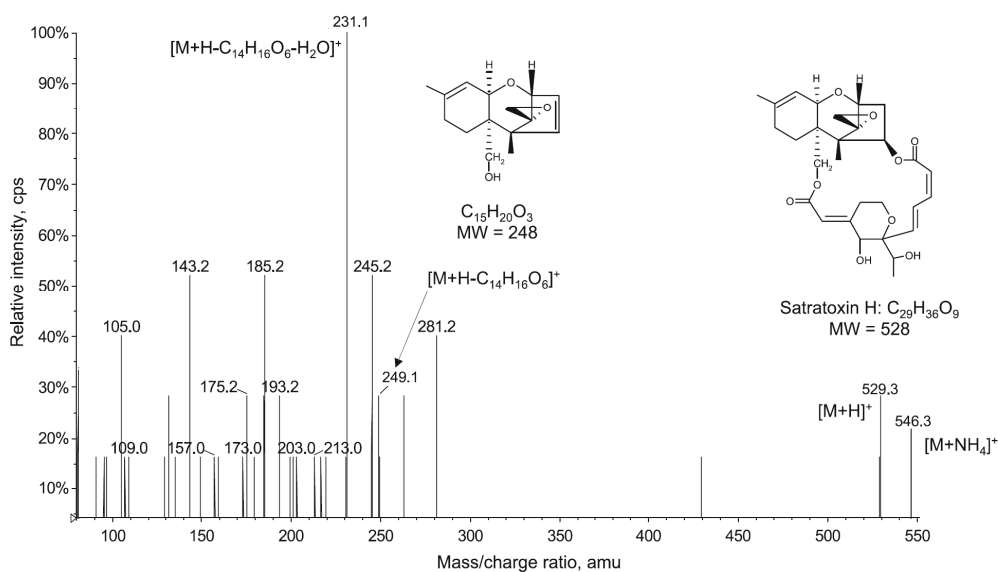


Fig. 2 Product ion spectrum (LC-MS/MS) of SH based on the precursor ion $[M+NH_4]^+$. Ionisation ESI+, ISV 4,000 V, DP 21 V

quantifier and one qualifier) were used: declustering potential (DP) 21 V, m/z 562.3/249.1 (collision energy (CE): 19 eV), and m/z 562.3/231.1 (CE: 21 eV). For SH: DP: 21 V, m/z 546.3/245.2 (CE: 25 eV), and m/z 546.3/231.1 (CE: 25 eV).

Results and Discussion

The recovery of SG and SH from polycarbonate filter membranes has been tested on one level (50 ng) with

three replicates. Recovery rates (mean \pm RSD) of 68 ± 3.4 and $56 \pm 4.8\%$ were obtained for SG and SH, respectively. No signals were observed after measurement of the control samples. Hence, this method was considered as suitable for indoor toxin measurements.

The indoor air of the *Stachybotrys*-affected dwelling was collected during 15 h at a flow rate of $5 \text{ m}^3/\text{h}$, corresponding to 75 m^3 total filtered air. A total toxin content of 19 ng SG and 32 ng SH was determined on the polycarbonate filter membrane by LC-MS/MS

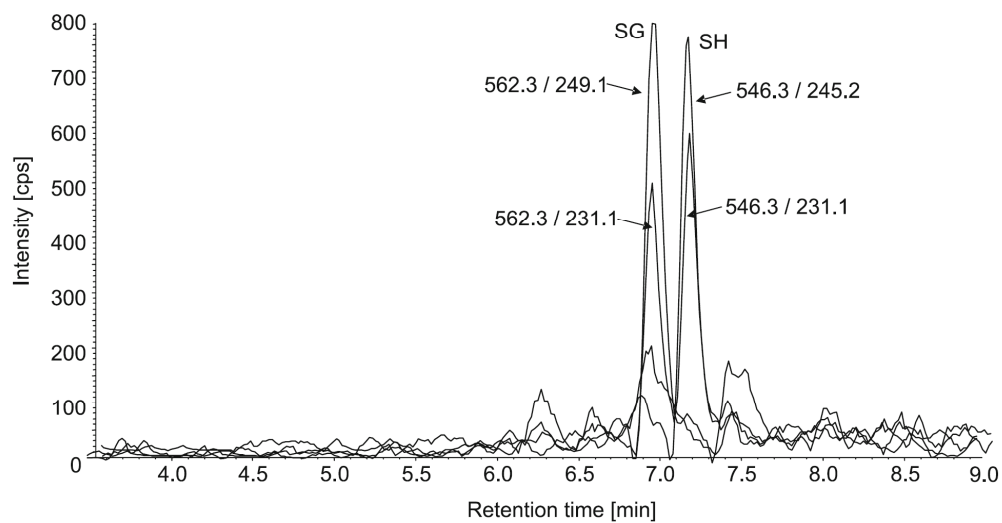


Fig. 3 MRM-chromatogram (LC-MS/MS) of SG and SH extracted from air filter membrane

(see chromatogram in Fig. 3), corresponding to a concentration of 0.25 ng/m^3 SG and 0.43 ng/m^3 SH in the indoor air. With regard to these concentrations, a total amount of $2.0 \text{ ng SG} + \text{SH}$ would have been inhaled during a stay of 8 h in this environment (respiratory minute volume: 6 l, at rest).

Sorenson et al. [21] first showed the possible inhalation of satratoxins after an experiment with artificially aerosolized conidia of *S. chartarum* in a laboratory model. Dust collected on glass-fibre filters consisted of more than 85% of conidia of *S. chartarum* and contained SG, SH and trichoverrols. Later, Brasel et al. [22] showed that macrocyclic trichothecenes could exist on fungal fragments even smaller than conidia. Recently, they also examined airborne macrocyclic trichothecenes in *S. chartarum*-contaminated buildings [23]. The results of ELISA showed toxin levels between 0.01 and 1.3 ng/m^3 in sampled air. These levels are comparable to the LC-MS/MS confirmed concentrations of SG and SH in the present case. Furthermore, because of the concurrent detection in the wallpaper [10], it could be proven that *Stachybotrys* toxins actually were transferred from mouldy indoor materials into indoor air. Whether these concentrations are high enough to contribute to the diseases of the sick-building syndromes' complex must be concluded after further study.

Acknowledgement The authors want to thank the H. Wilhelm Schaumann foundation for the financial support.

References

- Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health*. 1996;68:207–18.
- Scheel CM, Rosing WC, Farone AL. Possible sources of sick building syndrome in a Tennessee middle school. *Arch Environ Health*. 2001;56:413–7.
- Jarvis BB, Sorenson WG, Hintikka EL, Nikulin M, Zhou Y, Jiang J, et al. Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:3620–5.
- Dearborn DG, Yike I, Sorenson WG, Miller MJ, Etzel RA. Overview of investigation into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. *Environ Health Perspect*. 1999;107 Suppl 3:495–9.
- Flappan SM, Portnoy J, Jones P, Barnes C. Infant pulmonary hemorrhage in a suburban home with water damage and mold (*Stachybotrys atra*). *Environ Health Perspect*. 1999;107:927–30.
- Jarvis BB, Lee Y-W, Comezoglu SN, Yatawara CS. Trichothecenes produced by *Stachybotrys atra* from Eastern Europe. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51:915–8.
- Andersson MA, Nikulin M, K ljalg U, Andersson MC, Rainey F, Reijula K, et al. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63:387–93.
- Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka E-L, Lindroos O, et al. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:1899–904.
- Nielsen KF, Hansen MO, Larsen TO, Thrane U. Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum

- boards in Danish buildings. *Int Biodeterior Biodegrad*. 1998;42:1–7.
10. Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC–MS/MS. *Mycotoxin Res*. 2006;22:189–92.
 11. Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. Microfungal contamination of damp buildings—examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect*. 1999;107 Suppl 3:505–8.
 12. Elidemir O, Colasurdo GN, Rossmann SN, Leland LF. Isolation of *Stachybotrys* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. *Pediatrics*. 1999;104:964–6.
 13. Yike I, Distler AM, Ziady AG, Dearborn DG. Mycotoxin adducts on human serum albumin: biomarkers of exposure to *Stachybotrys chartarum*. *Environ Health Perspect*. 2006;114:1221–5.
 14. Mader DR, Yike I, Distler AM, Dearborn DG. Acute pulmonary hemorrhage during isoflurane anesthesia in two cats exposed to toxic black mold (*Stachybotrys chartarum*). *J Am Vet Med Assoc*. 2007;231:731–5.
 15. Kuhn DM, Ghannoum MA. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:144–72.
 16. Terr AI. *Stachybotrys*: relevance to human disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87 Suppl 3:57–63.
 17. Johanning E, Gareis M, Nielsen KF, Dietrich R, Märtlbauer E. Airborne mycotoxin sampling and screening analysis. Conference transcript Indoor Air 2002, The 9th international conference on indoor air quality and climate. Santa Cruz, California: The International Academy of Indoor Air Sciences; 2002, p. 1–6.
 18. Bloom E, Bal K, Nyman E, Must A, Larsson L. Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. *App Environ Microbiol*. 2007;73:4211–7.
 19. Nielsen KF, Smedsgaard J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A*. 2003;1002:111–36.
 20. Berger U, Oehme M, Kuhn F. Quantitative determination and structure elucidation of Type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 1999;47:4240–5.
 21. Sorenson WG, Frazer DG, Jarvis BB, Simpson J, Robinson VA. Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53:1370–5.
 22. Brasel TL, Douglas DR, Wilson SC, Straus DC. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:114–22.
 23. Brasel TL, Martin JM, Carriker CG, Wilson SC, Straus DC. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:7376–88.

9 ANHANG

9 ANHANG
Trichothecene
Tablelle 13: Verfahrenskendaten der LC-MS/MS Multimethode für Typ A, B und D

Toxin	Precursor Ion	Product-Ions	Arbeitsbereich** [ng/ml]	nach DIN 32645 ermittelt			Verfahrens- standard- abweichung	über S/N-Verhältnis ermittelt		CV [%] (n=5)		
				LOD* [ng/ml]	LOQ* [ng/ml]	Korrelation R ^{2**} (Kalibrationspunkte)		LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Niveau: 1 ng/ml	Niveau: 10 ng/ml	
Trichothecene Typ A												
T-2	484,0	215,2	Quantifier	LOD-250	0,20	0,66	0,9998 (15)	0,069	0,026	0,078	1,8	2,2
		305,2	Qualifier	LOD-250	0,31	1,1	0,9995 (16)	0,11	0,036	0,11	4,3	1,4
HT-2	442,4	263,2	Quantifier	LOD-200	0,32	1,1	0,9995 (16)	0,12	0,061	0,18	3,3	1,6
		215,1	Qualifier	LOD-200	0,35	1,2	0,9994 (16)	0,13	0,076	0,23	6,4	2,9
T-2 Tetraol	316,2	215,2	Quantifier	LOD-250	0,41	1,4	0,9992 (14)	0,14	0,10	0,30	6,5	2,9
		281,3	Qualifier	LOD-250	0,77	2,6	0,9976 (11)	0,25	0,49	1,5	18	3,6
T-2 Triol	400,2	215,1	Quantifier	LOD-250	0,16	0,53	0,9998 (15)	0,055	0,066	0,20	4,0	1,2
		281,2	Qualifier	LOD-250	0,27	0,92	0,9996 (15)	0,096	0,16	0,49	6,7	4,4
DAS	384,2	247,1	Quantifier	LOD-250	0,085	0,29	0,9999 (15)	0,030	0,030	0,089	4,1	1,8
		307,3	Qualifier	LOD-250	0,11	0,36	0,9999 (16)	0,038	0,048	0,14	2,9	1,8
MAS	342,2	107,1	Quantifier	LOD-250	0,085	0,29	0,9999 (16)	0,031	0,012	0,035	2,2	1,3
		265,1	Qualifier	LOD-250	0,14	0,47	0,9998 (16)	0,050	0,021	0,063	1,8	1,0
NEO	400,2	245,1	Quantifier	LOD-250	0,11	0,35	0,9999 (16)	0,038	0,029	0,087	3,8	0,5
		305,3	Qualifier	LOD-250	0,11	0,38	0,9999 (16)	0,041	0,021	0,064	2,9	2,3
DacVOL	368,3	291,2	Quantifier	LOD-250	0,064	0,22	0,9999 (15)	0,023	0,017	0,051	3,1	1,0
		249,1	Qualifier	LOD-250	0,37	1,2	0,9994 (14)	0,13	0,36	1,1	8,2	1,8
VOL	284,3	267,2	Quantifier	LOD-200	0,34	1,1	0,9995 (15)	0,12	0,27	0,82	7,6	0,8
		249,3	Qualifier	LOD-200	0,45	1,5	0,9992 (12)	0,15	0,35	1,1	14	1,7
Trichothecene Typ B												
DON	294,9	265,0	Quantifier	LOD-250	0,092	0,31	0,9999 (16)	0,033	0,038	0,11	2,8	1,4
		138,0	Qualifier	LOD-250	0,13	0,45	0,9999 (16)	0,048	0,035	0,11	4,7	1,0
15-acDON	356,1	137,2	Quantifier	LOD-250	0,14	0,46	0,9999 (16)	0,049	0,033	0,099	4,7	2,3
		321,1	Qualifier	LOD-250	0,22	0,76	0,9998 (16)	0,080	0,072	0,22	5,0	1,8
3-acDON	356,3	231,0	Quantifier	LOD-250	0,28	0,96	0,9996 (15)	0,10	0,14	0,42	8,4	1,5
		203,0	Qualifier	LOD-250	0,36	1,2	0,9994 (15)	0,13	0,14	0,42	8,6	1,7
NIV	357,1	281,0	Quantifier	LOD-250	0,70	2,2	0,9980 (10)	0,21	1,2	3,6	11	1,1
		202,8	Qualifier	LOD-250	0,97	3,1	0,9964 (10)	0,29	1,3	3,9	13	6,5
FX	372,1	355,1	Quantifier	LOD-250	0,11	0,37	0,9999 (16)	0,039	0,12	0,35	4,8	1,1
		247,2	Qualifier	LOD-250	0,18	0,62	0,9997 (15)	0,065	0,047	0,14	3,8	1,0
Trichothecene Typ D												
SG	562,2	249,2	Quantifier	LOD-250	0,28	0,95	0,9993 (15)	0,10	0,038	0,11	5,3	1,4
		231,2	Qualifier	LOD-250	0,29	0,97	0,9996 (16)	0,10	0,068	0,21	6,9	1,5
SH	546,5	281,1	Quantifier	LOD-200	0,38	1,3	0,9993 (15)	0,13	0,16	0,46	9,1	3,1
		529,2	Qualifier	LOD-200	0,44	1,5	0,9991 (15)	0,15	0,94	2,8	15	2,0
VA	520,4	457,3	Quantifier	LOD-250	0,20	0,67	0,9996 (16)	0,072	0,044	0,13	2,5	0,7
		249,1	Qualifier	LOD-250	0,28	0,95	0,9994 (16)	0,10	0,085	0,26	4,6	0,6
RA	550,5	533,4	Quantifier	LOD-250	0,22	0,74	0,9995 (15)	0,078	0,021	0,063	3,9	1,7
		249,2	Qualifier	LOD-250	0,24	0,80	0,9964 (14)	0,084	0,015	0,045	6,3	1,7

* Ergebnisunsicherheit 33,3 %; Irrtumswahrscheinlichkeit 1 %; Anzahl der Messungen: 1

** lineare Regression

Tabelle 14: MRM-Übergänge und substanzspezifische Parameter der Multimethode für Typ D Trichothecene

Analyt	MW [g/mol]	Mutterion	Tochterionen	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [eV]	CXP [V]	Dwell time [msec]		
SG	544	[M+NH4] ⁺	562,3	Quantifier	231,0	21	3,5	22	19	22	40
				Qualifier	248,9	21	3,5	22	21	22	40
SH	528	[M+NH4] ⁺	546,3	Quantifier	245,2	21	4,5	20	25	22	40
				Qualifier	231,0	21	4,5	20	25	18	40
SF	542	[M+NH4] ⁺	560,4	Quantifier	249,1	41	4,0	26	21	12	40
				Qualifier	231,1	41	4,0	26	21	12	40
RA	532	[M+NH4] ⁺	550,4	Quantifier	249,1	26	3,5	24	23	20	40
				Qualifier	133,0	26	3,5	24	41	10	40
RE	514	[M+NH4] ⁺	532,4	Quantifier	249,1	31	4,5	20	21	22	40
				Qualifier	231,1	31	4,5	20	25	20	40
RL-2	530	[M+NH4] ⁺	548,3	Quantifier	249,1	31	4,0	24	21	22	40
				Qualifier	231,0	31	4,0	24	21	18	40
VA	502	[M+NH4] ⁺	520,4	Quantifier	248,8	31	5,0	24	23	22	40
				Qualifier	230,9	31	5,0	24	27	20	40
VJ	484	[M+NH4] ⁺	502,4	Quantifier	249,0	30	5,0	25	25	22	40
				Qualifier	231,0	30	5,0	25	25	22	40

Tabelle 15: Wiederfindungsraten für die Matrix Weizen, LC-MS/MS Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene

Analyt	Wiederfindungsraten Matrix Weizen auf 3 Niveaus (n = 5)						mittlere Wiederfindung
	Spikelevel 1 µg/kg		Spikelevel 10 µg/kg		Spikelevel 50 µg/kg		
	Mittelwert	RSD	Mittelwert	RSD	Mittelwert	RSD	
Trichothecene Typ A							
T-2	104 %	2,7 %	109 %	0,9 %	110 %	0,9 %	108 %
HT-2	93 %	6,1 %	100 %	1,7 %	100 %	3,0 %	98 %
T-2 Triol	97 %	8,3 %	96 %	4,0 %	97 %	1,0 %	97 %
T-2 Tetraol	78 %	5,8 %	68 %	3,4 %	73 %	6,5 %	73 %
DAS	106 %	0,5 %	107 %	1,4 %	105 %	1,4 %	106 %
MAS	100 %	1,0 %	102 %	1,5 %	101 %	1,5 %	101 %
NEO	97 %	5,7 %	101 %	6,1 %	101 %	2,1 %	99 %
DacVOL	95 %	4,0 %	95 %	1,8 %	97 %	2,2 %	96 %
VOL	98 %	6,4 %	105 %	3,2 %	100 %	3,6 %	101 %
Trichothecene Typ B							
DON	72 %	9,8 %	104 %	5,8 %	100 %	3,3 %	92 %
3-acDON	106 %	3,4 %	100 %	5,7 %	104 %	4,9 %	104 %
15-acDON	93 %	5,8 %	97 %	4,2 %	103 %	3,4 %	98 %
NIV	71 %	10 %	60 %	8,8 %	52 %	7,3 %	61 %
FX	83 %	6,1 %	88 %	3,5 %	89 %	2,0 %	87 %
Trichothecene Typ D							
SG	90 %	7,1 %	90 %	2,9 %	94 %	2,2 %	91 %
SH	86 %	5,8 %	85 %	5,4 %	89 %	4,4 %	87 %
RA	101 %	3,4 %	109 %	1,5 %	110 %	1,0 %	107 %
VA	75 %	3,8 %	78 %	2,1 %	82 %	3,5 %	78 %

Tabelle 16: Wiederfindungsraten für die Matrix Roggen, LC-MS/MS Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene

Analyt	Wiederfindungsraten Matrix Roggen auf 3 Niveaus (n = 5)						mittlere Wiederfindung
	Spikelevel 1 µg/kg		Spikelevel 10 µg/kg		Spikelevel 50 µg/kg		
	Mittelwert	RSD	Mittelwert	RSD	Mittelwert	RSD	
Trichothecene Typ A							
T-2	88 %	2,6 %	100 %	1,3 %	98 %	1,2 %	95 %
HT-2	81 %	5,1 %	102 %	1,9 %	95 %	1,6 %	93 %
T-2 Triol	90 %	5,5 %	94 %	1,4 %	93 %	2,2 %	92 %
T-2 Tetraol	82 %	3,1 %	71 %	1,3 %	71 %	5,8 %	75 %
DAS	98 %	2,9 %	105 %	1,2 %	100 %	0,7 %	101 %
MAS	81 %	3,4 %	91 %	0,9 %	85 %	1,9 %	85 %
NEO	87 %	8,3 %	90 %	7,6 %	93 %	3,3 %	90 %
DacVOL	83 %	1,0 %	90 %	1,2 %	85 %	0,9 %	86 %
VOL	84 %	3,6 %	85 %	4,5 %	81 %	4,1 %	83 %
Trichothecene Typ B							
DON	99 %	7,0 %	90 %	5,2 %	79 %	4,0 %	89 %
3-acDON	92 %	6,1 %	94 %	4,5 %	102 %	1,6 %	96 %
15-acDON	91 %	9,4 %	96 %	5,1 %	98 %	1,4 %	95 %
NIV	68 %	8,8 %	74 %	6,3 %	59 %	4,6 %	67 %
FX	76 %	3,3 %	92 %	8,6 %	84 %	2,1 %	84 %
Trichothecene Typ D							
SG	78 %	5,5 %	83 %	3,1 %	88 %	1,0 %	83 %
SH	83 %	7,4 %	85 %	7,0 %	87 %	2,1 %	85 %
RA	77 %	4,0 %	92 %	3,9 %	93 %	3,6 %	87 %
VA	71 %	2,7 %	77 %	1,2 %	79 %	3,9 %	76 %

Tabelle 17: Wiederfindungsraten für die Matrix Hafer, LC-MS/MS Multimethode für Typ A, B und D Trichothecene

Analyt	Wiederfindungsraten Matrix Hafer auf 3 Niveaus (n = 5)						mittlere Wiederfindung
	Spikelevel 1 µg/kg		Spikelevel 10 µg/kg		Spikelevel 50 µg/kg		
	Mittelwert	RSD	Mittelwert	RSD	Mittelwert	RSD	
Trichothecene Typ A							
T-2	104 %	2,4 %	102 %	3,7 %	104 %	1,7 %	103 %
HT-2	100 %	4,4 %	104 %	3,7 %	102 %	1,1 %	102 %
T-2 Triol	100 %	6,4 %	100 %	2,4 %	97 %	3,8 %	99 %
T-2 Tetraol	64 %	9,2 %	58 %	6,0 %	57 %	2,6 %	60 %
DAS	107 %	3,0 %	110 %	2,0 %	106 %	0,9 %	107 %
MAS	97 %	2,1 %	98 %	3,3 %	97 %	1,4 %	97 %
NEO	97 %	3,8 %	99 %	4,1 %	97 %	1,7 %	98 %
DacVOL	96 %	4,2 %	93 %	3,6 %	97 %	1,3 %	96 %
VOL	97 %	4,7 %	97 %	5,1 %	91 %	5,1 %	95 %
Trichothecene Typ B							
DON	99 %	9,9 %	97 %	5,8 %	99 %	3,0 %	98 %
3-acDON	99 %	4,5 %	100 %	3,7 %	98 %	5,5 %	99 %
15-acDON	102 %	5,7 %	103 %	2,7 %	100 %	2,6 %	102 %
NIV	< LOQ	< LOQ	71 %	4,4 %	62 %	5,8 %	67 %
FX	104 %	3,0 %	90 %	1,8 %	88 %	1,8 %	94 %
Trichothecene Typ D							
SG	92 %	7,0 %	101 %	4,0 %	101 %	2,0 %	98 %
SH	87 %	8,0 %	95 %	3,0 %	94 %	2,0 %	92 %
RA	80 %	8,0 %	99 %	6,0 %	87 %	11 %	89 %
VA	74 %	7,0 %	81 %	7,0 %	87 %	6,0 %	81 %

Tabelle 18: Morphologische Charakterisierung von Proben verschimmelter Innenraum-Materialien

Probe Nr.	Typ	<i>Acremonium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aureobasidium</i> spp.	<i>Chaetomium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Cryosporium</i> spp.	<i>Gliocladium</i> spp.	<i>Memmoniella</i> spp.	<i>Monosporium</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Scopulariopsis</i> spp.	<i>Stachybotrys</i> spp.	<i>Ulocladium</i> spp.
1	Abstrich						x					x	x				
2	Abstrich											x	x				
3	Tapete		x			x							x			x	
4	Abstrich				x												
5	Abstrich				x		x						x				
6	Staub						x					x	x				
7	Staub																
8	Abstrich						x						x				
9	Tapete												x			x	
10	Gipskarton			x									x			x	
11	Putz			x						x			x				
12	Putz												x				
13	Putz			x				x				x					
14	Abstrich		x	x			x						x				
15	Abstrich			x													
16	Putz						x						x				
17	Putz			x									x				x
18	Putz						x										
19	Abstrich																
20	Abstrich	x		x			x				x						
21	Putz											x	x				
22	Gipskarton			x									x			x	
23	Abstrich			x													
24	Abstrich						x						x				
25	Abstrich																
26	Putz																
27	Putz																x
28	Abstrich		x				x						x				x
29	Abstrich						x						x				
30	Tapete			x												x	
31	Putz			x												x	
32	Abstrich			x									x				x
33	Staub			x													
34	Abstrich		x				x						x				

Tabelle 18: Fortsetzung

		<i>Acremonium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aureobasidium</i> spp.	<i>Chaetomium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Cryosporium</i> spp.	<i>Gliocladium</i> spp.	<i>Memmoniella</i> spp.	<i>Monosporium</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Scopulariopsis</i> spp.	<i>Stachybotrys</i> spp.	<i>Ulocladium</i> spp.
Probe Nr.	Typ																
35	Abstrich																
36	Abstrich																
37	Abstrich			x			x						x				
38	Abstrich			x											x		
39	Abstrich		x	x			x					x	x				x
40	Abstrich																
41	Abstrich																
42	Abstrich				x		x						x				
43	Abstrich						x										
44	Abstrich																
45	Putz																x
46	Abstrich		x										x				
47	Putz												x				
48	Tapete								x			x					
49	Abstrich												x				
50	Abstrich			x									x				
51	Putz												x				
52	Abstrich							x					x				x
53	Abstrich			x			x						x				
54	Abstrich			x			x						x				
55	Staub			x								x	x				
56	Tapete												x				
57	Gipskarton		x										x			x	x
58	Putz												x				
59	Putz					x							x				
60	Tapete			x									x			x	
61	Putz			x									x			x	
62	Tapete		x	x			x						x		x		
63	Tapete	x					x										
64	Tapete						x						x				
65	Gipskarton					x											x
66	Gipskarton			x		x											x
67	Gipskarton					x											x
68	Gipskarton																x
69	Abstrich			x		x							x	x			
Summe positiv		2	8	25	3	6	21	1	2	1	1	8	41	1	2	13	8
Anteil (%)		2,9	12	36	4,3	8,7	30	1,4	2,9	1,4	1,4	12	59	1,4	2,9	19	12

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2004 bis Dezember 2008 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan und am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) angefertigt.

Finanzielle Mittel für die durchgeführten Projekte wurden durch das Bayerische Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz (Projekte UGV 04040803050 und UGV 04060803087) sowie die H. Wilhelm Schaumann Stiftung bereitgestellt. Dafür herzlichen Dank!

Herrn Prof. Bauer danke ich ganz besonders für die Möglichkeit zur Promotion am Lehrstuhl für Tierhygiene, für die hervorragende Betreuung und die überaus freundliche Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank auch für die freie Hand, die mir als „Jungforscher“ bei der Projektdurchführung gelassen wurde und das allzeit offene Ohr für Dinge, die oft auch weit über die rein fachlichen Themen hinausgingen.

Ganz herzlichen Dank auch an Frau Dr. Engelhardt, ohne deren Initiative dieses Projekt nicht zustande gekommen wäre. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme am LGL, die Unterstützung in allen Phasen der Arbeit, vor allem auch noch von außerhalb des LGLs, und die wertvollen Hinweise und Korrekturen beim Schreiben der Publikationen.

Gleichzeitig danke ich Herrn Dr. Brunner für die Möglichkeit, dass dieses Forschungsprojekt am LGL Oberschleißheim durchgeführt und die dortigen Einrichtungen genutzt werden konnten. Vor allem danke ich auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen, sodass ich mich wie ein richtiger Mitarbeiter des Hauses fühlen durfte und über die Doktorarbeit hinaus viel über die amtliche Lebensmittelüberwachung lernen konnte.

Frau Dr. Lange, Herrn Dr. Rapp und Herrn Dr. Berger vielen herzlichen Dank für die Betreuung von amtlicher Seite; ganz besonderen Dank für die Unterstützung meines Projekts und die Möglichkeit zur selbständigen Durchführung, gleichzeitig auch für die immer gewährte Hilfe bei allen aufgetretenen Problemen und bei der Probenbeschaffung, die einen immensen Mehraufwand durch die Vielzahl zusätzlicher Proben verursachte.

Meinem Kollegen und besten Chemieingenieur, Herrn Jörg Barthel, vielen, vielen Dank für die super Zusammenarbeit, ohne die die am LGL gelaufenen Projekte sicher nur schwer in dieser Zeit hätten bewältigt werden können. Danke für die enorme Mehrarbeit im Labor, die unzähligen Arbeitsbesprechungen und Diskussionen, sowie die Unterstützung, wenn ich mal wieder nicht mehr wusste, wie ich mich gleichzeitig in Freising und Oberschleißheim hätte aufhalten sollen.

Allen Mitarbeitern des Mykotoxinlabors in Oberschleißheim, Frau Friderike Laube, Frau Ursel Böhm, Frau Katja Meindl, Frau Caro Weingarten, Herrn Gerald Sommerfeld sowie den Praktikantinnen Frau Vera Täschner und Frau Martina Denner, vielen Dank für die schöne Zeit, die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfe im Labor, für's Mahlen, Homogenisieren und Versorgen meiner Proben. Und auch allen anderen Mitarbeitern des LGL, Frau Susanne Brendel, Frau Ulrike Hohenberger, Frau Sylvia Sparrer und Herrn Dr. Dieter Sparrer, sowie meinen lieben Bürokollegen, die mich während meiner Promotion am Amt begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die schöne gemeinsame Zeit, das Interesse an meiner Arbeit, und, wenn es mal wieder nötig war, für die aufmunternden Worte danken.

Herrn Dr. Michael Kaschube vom LGL vielen Dank für die Prüfung diverser Risikobewertungen, die im Rahmen der Forschungsprojekte abgegeben worden sind.

Herrn Dr. Karsten Meyer vielen Dank für die Gesamtbetreuung der am LGL und am Lehrstuhl für Tierhygiene gelaufenen Projekte, für die vielen Besprechungen und für die Korrekturen der Abstracts, Poster, Berichte und Publikationen bis hin zu der vorliegenden Dissertation.

Allen meinen Kollegen und Freunden vom Lehrstuhl für Tierhygiene sei ganz, ganz herzlich für die wunderbare, kollegiale Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit gedankt. Diese wird mir zusammen mit unseren vielen gemeinsamen Festen und Feiern (ich sag' nur Maibaumfest, Kramperlfest und Stoibermühle) immer in Erinnerung bleiben! Zusätzlich noch ein extragroßes Dankeschön an Frau Barbara Dörr, Frau Monika Held, Frau Andrea Schott und Herrn Rene Mamet für die ausgezeichnete Hilfe im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich noch ganz besonders meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer für mich da waren, an mich geglaubt haben, mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben!

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Gottschalk
Vorname: Christoph
Geburtstag: 28. Oktober 1978
Geburtsort: München

AUSBILDUNG

09/1985 – 07/1989 Grundschule Ebenhausen
09/1989 – 06/1998 Gymnasium der Benediktiner Kloster Schäftlarn
11/1998 – 10/2004 Studium der Ökotrophologie an der Technischen Universität München-Weihenstephan
10/2002 – 02/2003 Auslandssemester an der Universidad Politécnica de Valencia, Spanien
10/2004 – 12/2008 Promotion am Lehrstuhl für Tierhygiene, Technische Universität München-Weihenstephan

BERUFSERFAHRUNG UND PRAKTIKA

02/1999 – 02/2000 Studentische Hilfskraft am GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg bei München
03/2000 – 04/2000 Praktikum im Evangelischen Alten- und Pflegeheim Ebenhausen
10/2001 – 02/2002 Praktikum bei LSG Sky Chefs, Flughafen München
07/2002 – 07/2003 Mitarbeiter auf Abruf beim LSG Hygiene Institute, Flughafen München
10/2004 – 12/2008 Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Tierhygiene, Technische Universität München-Weihenstephan
10/2005 – 03/2009 Freier Mitarbeiter beim LSG Hygiene Institute/TÜV Süd Management Service GmbH
seit 04/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

PUBLIKATIONEN

Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotoxin Research*. 2006;22:189-192.

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:1547-1553.

Fodor J, Meyer K, Gottschalk C, Mamet R, Kametler L, Bauer J, Horn P, Kovacs F, Kovacs M. *In vitro* microbial metabolism of fumonisin B1. *Food Add Contam*. 2007;24:416-420.

Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Detection of satratoxin G and H in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia*. 2008;166:103-107.

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Add Contam*. 2009; im Druck (submitted 09.10.2008, accepted 28.04.2009).

POSTER UND VORTRÄGE

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Determination of trichothecenes type A in cereals and cereal products by LC-MS/MS. 28. Mycotoxin-Workshop, Bydgoszcz/Polen, 29.-31.05.2006.

Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. 28. Mycotoxin-Workshop, Bydgoszcz/Polen, 29.-31.05.2006.

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Trichothecene in Getreide und Getreideprodukten - Nachweis mittels LC-MS/MS. 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene - Dreiländertagung, Garmisch-Partenkirchen, 26.-29.09.2006.

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Occurrence of type A and B trichothecenes in wheat, rye and oats from 2005 and 2006. 29. Mycotoxin-Workshop, Stuttgart-Fellbach, 14.-16.05.2007.

Gottschalk C, Barthel J, Aulwurm U, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Application of a gel permeation chromatography-LC-MS/MS method for the determination of various mycotoxins in edible oils – results of the method development. 30. Mycotoxin-Workshop, Utrecht, Holland, 28.-30.04.2008.

Gottschalk C, Barthel J, Rapp M, Berger M, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Assessment of a multi-mycotoxin contamination of maize and maize products. 31. Mykotoxin-Workshop, Münster, 15.-17.06.2009.

Gottschalk C, Barthel J, Rapp M, Berger M, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Simultaneous detection of all currently EC-regulated mycotoxins in maize and maize products by LC-MS/MS. 31. Mykotoxin-Workshop, Münster, 15.-17.06.2009.

Barthel J, Berger M, Rapp M, Schlicht C, Ruhland M, Gottschalk C, Meyer K, Bauer J. Occurrence of 40 mycotoxins in malt germs and other feedstuffs – determination by LC-MS/MS. 31. Mykotoxin-Workshop, Münster, 15.-17.06.2009.