

Entwicklung von online- Detektionsverfahren für landwirtschaftlich relevante Analyten



kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

eingereicht in der Wissenschaftsdisziplin „Physikalische Chemie“
am Institut für Chemie – Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
an der Universität Potsdam

vorgelegt von

Alexander Erler

Potsdam, 28. Januar 2020

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben, Universität Potsdam
2. Gutachter: Frau Dr. Ursula Telgheder, Universität Duisburg-Essen
3. Gutachter: Prof. Dr. Michael W. Linscheid, Humbolt-Universität zu Berlin

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<https://doi.org/10.25932/publishup-47340>

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-473406>

i. Liste der Publikationen

1. **Erlor, A.**, Riebe, D, Beitz, T, et al. Detection of volatile organic compounds in the headspace above mold fungi by GC-soft X-radiation-based APCI-MS. *J Mass Spectrom.* 2018; 53: 911– 920 <https://doi.org/10.1002/jms.4210>
2. **Erlor, A.**; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Gebbers, R. Soil Nutrient Detection for Precision Agriculture Using Handheld Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) and Multivariate Regression Methods (PLSR, Lasso and GPR). *Sensors* **2020**, *20*, 418.
3. **Erlor, A.**, Riebe, D, Beitz, T, et al. Characterization of volatile metabolites formed by molds on barley by mass and ion mobility spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2020; 55:e4501. <https://doi.org/10.1002/jms.4501>
4. Riebe, D., **Erlor, A.**, Ritschel, T., Beitz, T., Löhmannsröben, H. -G., Beil, A., Blaschke, M., and Ludwig, T. (2016) Atmospheric pressure chemical ionization of explosives induced by soft X-radiation in ion mobility spectrometry: mass spectrometric investigation of the ionization reactions of drift gasses, dopants and alkyl nitrates. *J. Mass Spectrom.*, 51: 566– 577. doi: [10.1002/jms.3784](https://doi.org/10.1002/jms.3784).
5. C. Klein, S. Wietstock, **A. Erlor**, T. Beitz, G. Abraham, Mediakmentennachweis beim Pferd über die Atemluft mittels Gaschromatografie-Ionenmobilitätsspektrometrie, *Pneumologie* 2017; 71(06): 412-416, DOI: 10.1055/s-0037-1602734
6. Riebe, D.; **Erlor, A.**; Brinkmann, P.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Gebbers, R. Comparison of Calibration Approaches in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Proximal Soil Sensing in Precision Agriculture. *Sensors* **2019**, *19*, 5244.

ii. Vorträge

1. **A. Erler**, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben et al., Detektion von Schimmelpilzkontaminationen in Braugerste durch Massen- und Ionenmobilitätsspektrometrie, *7. IMS-Anwendertreffen Reutlingen 2018*

iii. Posterpräsentationen

1. **A. Erler**, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben, S. Wietstock, C. Klein, Atemluftanalyse in der Veterinärmedizin durch Ionenmobilitäts- und Massenspektrometrie, *Anakon 2015 Graz*
2. **A. Erler**, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben et al., Mycotoxin Screening of Brewing Barley by Optical Spectroscopy and Ion Mobility Spectrometry, *38th Mycotoxin Workshop Berlin 2016*
3. **A. Erler**, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben et al., Analyse flüchtiger organischer Kohlenwasserstoffe von Mykotoxin-bildenden Schimmelpilzen durch GC-MS und GC-IMS, *Anakon 2017 Tübingen*
4. **A. Erler**, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben et al., GC-soft X-radiation based APCI-MS for headspace investigation of volatile organic compounds produced by mold fungi, *13th Trends in Brewing Gent 2018, Brewing Summit San Diego 2018*
5. **A. Erler**, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben et al., Ion mobility spectrometry based headspace detection of volatile compounds produced by mold fungi, *EBC Congress 2019 Antwerp*
6. **A. Erler**, P. Brinkmann, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben et al., Laser-induced breakdown spectroscopy for soil sensing of nutrients on two different agricultural fields near Wilmersdorf and Görzig, *Bonares Status Seminar 2019 Leipzig, Anakon 2019 Münster*

iv. Zusammenfassung

Die Entwicklung nachhaltiger Bewirtschaftungs- und Produktionsmethoden ist eine der zentralen Fragestellungen der modernen Agrarwirtschaft. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Forschungsthemen, die das Konzept Nachhaltigkeit beinhalten. In beiden Fällen werden analytische Grundlagen für die Entwicklung entsprechender landwirtschaftlicher Arbeitsmethoden gelegt.

Das erste Thema ist an den sogenannten Präzisionsackerbau angelehnt. Bei diesem wird die Bearbeitung von Agrarflächen ortsabhängig ausgeführt. Das heißt, die Ausbringung von Saatgut, Dünger, Bewässerung usw. richtet sich nach den Eigenschaften des jeweiligen Standortes und wird nicht pauschal gleichmäßig über ein ganzes Feld verteilt. Voraussetzung hierfür ist eine genaue Kenntnis der Bodeneigenschaften. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Parameter mittels der analytischen Technik der Laser-induzierten Breakdown Spektroskopie (LIBS), die eine Form der Elementaranalyse darstellt, bestimmt werden. Bei den hier gesuchten Bodeneigenschaften handelte es sich um die Gehalte von Nährstoffen sowie einige sekundäre Parameter wie den Humusanteil, den pH-Wert und den pflanzenverfügbaren Anteil einzelner Nährstoffe. Diese Eigenschaften wurden durch etablierte Referenzanalysen bestimmt. Darauf aufbauend wurden die Messergebnisse der LIBS-Untersuchungen durch verschiedene Methoden der sogenannten multivariaten Datenanalyse (MVA) ausgewertet. Daraus sollten Modelle zur Vorhersage der Bodenparameter in zukünftigen LIBS-Messungen erarbeitet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass mit der Kombination von LIBS und MVA sämtliche Bodenparameter erfolgreich vorhergesagt werden konnten. Dies beinhaltete sowohl die tatsächlich messbaren Elemente als auch die sekundären Eigenschaften, welche durch die MVA mit den Elementgehalten in Zusammenhang gebracht wurden.

Das zweite Thema beschäftigt sich mit der Vermeidung von Verlusten durch Schädlingsbefall bei der Getreidelagerung. Hier sollten mittels der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) Schimmelpilzkontaminationen detektiert werden. Dabei wurde nach den flüchtigen Stoffwechselprodukten der Pilze gesucht. Die durch Referenzmessungen mit Massenspektrometern identifizierten Substanzen konnten durch IMS im Gasvolumen über den Proben, dem sogenannten Headspace, nachgewiesen werden. Dabei wurde nicht nur die Anwesenheit einer Kontamination festgestellt, sondern diese auch charakterisiert. Die freigesetzten Substanzen bildeten spezifische Muster, anhand derer die Pilze identifiziert werden konnten. Hier wurden sowohl verschiedene Gattungen als auch einzelne Arten unterschieden. Die Messungen fanden auf verschiedenen Nährböden statt um den Einfluss dieser auf die Stoffwechselprodukte zu beobachten. Auch die sekundären Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze, die Mykotoxine, konnten durch IMS detektiert werden.

Beide in dieser Arbeit vorgestellten Forschungsthemen konnten erfolgreich abgeschlossen werden. Sowohl LIBS als auch IMS erwiesen sich für den Nachweis der jeweiligen Analyten als geeignet, und der Einsatz moderner computergestützter Auswertemethoden ermöglichte die genaue Charakterisierung der gesuchten Parameter. Beide Techniken können in Form von mobilen Geräten verwendet werden und zeichnen sich durch eine schnelle und sichere Analyse aus. In Kombination mit entsprechenden Modellen der MVA sind damit alle Voraussetzungen für Vor-Ort-Untersuchungen und damit für den Einsatz in der Landwirtschaft erfüllt.

v. Abstract

The basis of modern agriculture is sustainable cultivation and production. Two of the research subjects of this thesis are related to this topic. The aim of both is the development of an analytical method for sustainable agriculture.

The first topic is an application for precision agriculture, which is the site specific cultivation of agricultural areas. The local properties of each m² of the field are determined and used for sowing, fertilizing or irrigation instead of using standardized quantities for the entire field. This practice requires detailed knowledge of the soil properties. In this work, some of these soil properties were determined by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), which is a form of elementary analysis. The evaluated properties are the total amounts of several elemental nutrients as well as some secondary parameters, such as pH value, humus-content and the plant available contents of a number of nutrients. Soil samples with reference values from established analytical methods were used. Various methods of multivariate analysis (MVA) were used for developing different calibration models based on the LIBS data. These models can be used to predict soil properties from future LIBS experiments on soils. The results of the combination of LIBS and MVA were reliable predictions for the total amounts of elements, which can directly be correlated to LIBS signals in the measurements, as well as the secondary parameters, which can only be correlated with the LIBS spectra by MVA.

The second topic of this thesis was the detection of pest infestations of stored grains for preventing economic losses. Ion mobility spectrometry (IMS) was used to detect mould fungus contaminations. The target substances were volatile metabolites emitted by the fungi. Reference measurements by mass spectrometry (MS) identified the substances found in the headspace of the samples, which are also detected by IMS. In addition to the detection of a contamination, an identification of the contaminant was also possible because the substances emitted by the fungi formed specific patterns. Therefore, it was possible to discriminate not only various fungus genera but also individual species. Additionally, the influence of different growth media used for fungus cultivation on the metabolites emitted was investigated. In addition to the detection of volatile metabolites, the direct detection of mycotoxins by IMS could also be demonstrated.

The goals of both research topics presented in this thesis were successfully achieved. LIBS and IMS could be used to detect the respective analytes and a characterization of the target parameters was possible using computer-assisted data processing. Common features of both techniques are the availability of mobile instrumentation and a fast and reliable analytical performance. In combination with MVA-based prediction models, they fulfil the requirements for in-field analysis, which potentially makes them well suited to a wide range of applications in modern agriculture.

Inhaltsverzeichnis

i.	Liste der Publikationen	iv
ii.	Vorträge	v
iii.	Posterpräsentationen	v
iv.	Zusammenfassung	vi
v.	Abstract	vii
<hr/>		
1.	Einführung	1
2.	Theorie	4
2.1.	Material	4
2.1.1.	Boden und Bodennährstoffe	4
2.1.2.	Schimmelpilze und Mykotoxine	6
2.2.	Methoden	7
2.2.1.	Laser-induzierte Breakdown Spektroskopie	7
2.2.2.	Ionenmobilitätsspektroskopie	12
2.2.3.	Gaschromatographie	20
2.2.4.	Massenspektrometrie	22
2.2.5.	Multivariate Datenanalyse	25
3.	Publikationen	33
3.1.	Verwendete analytische Arbeitsmethoden	33
3.2.	Detektion von Bodennährstoffen für den Präzisionsackerbau mit LIBS und multivariater Datenanalyse	35
3.3.	Detektion flüchtiger Verbindungen im Gasvolumen über Schimmelpilzen mittels Röntgen-basierter GC-APCI-MS	56
3.4.	Charakterisierung flüchtiger Schimmelpilzmetabolite auf Gerste durch Massen- und Ionenmobilitätsspektrometrie	73
4.	Diskussion	88
4.1.	Bodeneigenschaften	88
4.2.	Schimmelpilzkontaminationen	91
5.	Zusammenfassung und Ausblick	99
<hr/>		
I.	Literaturverzeichnis	101
II.	Abbildungsverzeichnis	105
III.	Formelverzeichnis	106
IV.	Abkürzungsverzeichnis	107
V.	Informationsmaterial	107
VI.	Danksagung	122
VII.	Eidesstattliche Versicherung	123

1. Einführung

Eine der größten Herausforderungen unserer Zeit ist die Ernährung einer ständig wachsenden Weltbevölkerung bei gleichzeitigem Erhalt der natürlichen Ressourcen und Lebensräume unseres Planeten. Weltweite Aktionen wie die Fridays-for-Future-Bewegung oder der Klimastreik 2019 versuchen Öffentlichkeit und Politik für Umwelt- und Klimaschutz zu sensibilisieren. Dabei sind diese Themen keinesfalls neu oder unbekannt. Am 25. September 2015 verabschiedete die Generalversammlung der Europäischen Union mit der Agenda 2030¹ eine Sammlung von Vorhaben und langfristigen politischen Zielen für eine nachhaltige Entwicklung.

Unter den darin festgehaltenen übergeordneten Zielen findet sich folgendes Zitat zum Stichwort Planet: „Wir sind entschlossen, den Planeten vor Schädigung zu schützen, unter anderem durch nachhaltigen Konsum und nachhaltige Produktion, die nachhaltige Bewirtschaftung seiner natürlichen Ressourcen und umgehende Maßnahmen gegen den Klimawandel, damit die Erde die Bedürfnisse der heutigen und der kommenden Generationen decken kann.“¹

In den konkreteren Ausführungen wird über „resiliente landwirtschaftliche Methoden“ welche „die Produktivität und den Ertrag steigern“ bei gleichzeitiger „Erhaltung der Ökosysteme“ sowie von „Investitionen in ... die Agrarforschung“ gesprochen.¹ In der Folge wurden in Deutschland z.B. von der Bundesregierung die Deutsche Nachhaltigkeitsstrategie² und vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) die Zukunftsstrategie ökologischer Landbau³ erarbeitet. Hierin wurden Ziele wie der Ausbau ökologisch genutzter landwirtschaftlicher Flächen auf 20 %² definiert, wofür unter anderem „Strategien für ... nachhaltige Produktionsverfahren“ entwickelt werden sollen. Weiterhin wurde festgelegt, dass „wissenschaftliche Erkenntnisse“ zu nutzen seien, um das „Management agrarökologischer Systeme“ zu verbessern und „Schwachstellen in der Verarbeitung“ landwirtschaftlicher Erzeugnisse zu minimieren.³ Konkret wurden im Maßnahmenkonzept 21 in der Zukunftsstrategie ökologischer Landbau verschiedene Schwerpunkte definiert wie zum Beispiel „Nährstoffmanagement und Bodenfruchtbarkeit“ und „Alternative Bekämpfung pilzlicher Krankheitserreger“.

In der vorliegenden Arbeit werden Forschungsthemen behandelt, die sich mit diesen beiden Schwerpunkten befassen. Zum einen wurden Untersuchungen zur orts aufgelösten Nährstoffbestimmung in Feldböden als Voraussetzung für den sogenannten Präzisionsackerbau (engl. precision agriculture) durchgeführt, zum anderen sollte ein Konzept für die Früherkennung von Schimmelpilzkontaminationen in Getreidelagern entwickelt werden. Diese Arbeiten wurden mit verschiedenen instrumentell analytischen Methoden durchgeführt und hatten das Ziel, die Anwendung dieser etablierten Techniken auf landwirtschaftlich relevante Fragestellungen auszudehnen. Hiermit sollten die Grundlagen für die Entwicklung entsprechender Analyse- bzw. Überwachungssysteme für Böden und Getreideerzeugnisse geschaffen werden.

Böden bilden die Basis der Biosphäre auf unserem Planeten⁴. Sie sind somit per definitionem diejenige Schicht der Erdkruste, welche sich durch das Vorhandensein von Leben auszeichnet. Sie stellen den Wachstumsstandort für Pflanzen dar und sind Lebensraum für Bodentiere und Mikroorganismen. Wasser-, CO₂- und Energiekreisläufe bauen Biomasse auf. Abgestorbene organische Substanz wird mineralisiert und so in Form von Nährstoffen dem Stoffkreislauf der Biosphäre zugeführt. Zudem dienen Böden als Speicher-, Filter-, Puffer- und Transportsysteme für Wasser, Nährstoffe und Schadstoffe. Sie sind z.B. ein Speichermedium für den Kohlenstoff, welcher hier in Form von Biomasse^{5,6} (Humus sowie das sogenannte soil organic carbon, SOC), Bodengasen (CO₂, CH₄) oder

Carbonat-Anionen vorliegt⁷ und ca. das Zwei- bis Dreifache der in der Atmosphäre und Vegetation vorhandenen Menge ausmacht⁸.

Eine effiziente Nutzung dieses komplexen Systems setzt genaue Kenntnisse über seine Beschaffenheit und Zusammensetzung voraus. Das ist eines der Konzepte des Präzisionsackerbaus. Eine genauere Definition dieses Begriffs wurde 2019 von der International Society of Precision Agriculture (ISPA) festgelegt. Sie lautet übersetzt wie folgt: „Präzisionsackerbau ist eine Management-Strategie, die zeitliche, räumliche und individuelle Daten sammelt, verarbeitet und analysiert und sie mit anderen Informationen kombiniert um eine Entscheidungsfindung zu unterstützen, welche sich auf die Verbesserung von Effizienz, Produktivität, Qualität, Gewinn und Erhaltung der agrarwirtschaftlich genutzten Ressourcen bezieht.“⁹ Die ISPA entstand als Organisations- und Kommunikationsplattform für Forschungsgruppen, die sich mit diesem Themenbereich beschäftigen. Sie veröffentlicht unter anderem das seit 1999 jährlich erscheinende International Journal on Advances in Precision Agriculture (Springer US, ISSN: 1385-2256).

Bei der Lagerung von Getreide ist die Vermeidung von Kontaminationen durch Mikroorganismen ein zentrales Thema. So wurde beispielsweise in den Jahren 2010 bis 2013 ein Verlust von 820.000 t Weizen durch derartigen Befall registriert, was etwa drei Prozent der bundesweit jährlichen Erntemenge entspricht.¹⁰ Im Fall der vorliegenden Arbeit wurden Schimmelpilze in Braugerste untersucht. Ziel war dabei eine Detektion flüchtiger Metabolite der Pilze in der Gasphase über dem befallenen Getreide. Schimmelpilze und die von ihnen gebildeten Mykotoxine¹¹ stellen ein weltweites Problem dar, da sie nahezu überall vorkommen und in hohem Maße gesundheitsschädigend sein können. Die Risiken reichen vom Verderb von Nahrung über allergische Reaktionen bis hin zu multiplen Organschäden.¹² Schimmelpilze sind auf Lebens- und Futtermitteln ebenso zu finden wie in der Bausubstanz von Gebäuden und können sich artenabhängig bei Temperaturen zwischen null und sechzig Grad Celsius ausbreiten. Die Abwehrsubstanzen der Pilze, die Mycotoxine, sind auch bei Temperaturen deutlich über einhundert Grad Celsius stabil. Die Entfernung dieser Stoffe bei gleichzeitigem Erhalt der befallenen Objekte ist nahezu unmöglich.

Die einzigen effektiven Strategien zur Bekämpfung von Schimmelpilzen sind die Eindämmung ihres Wachstums und die Aussortierung kontaminierter Matrices. Wachstumshemmend wirken Nährstoffmangel, bestimmte chemische Substanzen, konkurrierende Organismen und Wassermangel. Die effiziente Aussonderung von befallenem Material setzt eine exakte und frühzeitige Lokalisierung der Kontamination voraus.

Die Untersuchungen zur Nährstoffbestimmung wurden mittels der Laser-induzierten Breakdown Spektroskopie¹³ durchgeführt. Diese Technik beruht auf der Anregung bzw. Ionisation der Analyten durch einen Laser mit anschließender Detektion der emittierten spezifischen elektromagnetischen Strahlung. Es handelt sich dabei im Allgemeinen um eine Form der Elementanalyse. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass so gut wie keine Präparation der extrem geringen Probenmenge notwendig ist, alle Elemente analysiert werden können (in Abh. der eingestellten Parameter) und die Analyse in Echtzeit erfolgt.¹⁴ Die Anwendungsmöglichkeiten sind vielfältig, z.B. in der Umweltanalytik¹⁵⁻¹⁷, industriellen Prozessüberwachung^{18,19}, Lebensmittelkontrolle²⁰ oder in der Raumfahrt²¹⁻²³.

Für die Detektion der Schimmelpilzmetabolite kamen die Massenspektrometrie²⁴ (MS) und die Ionenmobilitätsspektrometrie²⁵ (IMS) zum Einsatz. Beide Techniken zeichnen sich dadurch aus, dass Analytionen unter dem Einfluss elektrischer Felder getrennt werden. Die Trennung der ionisierten Analytmoleküle beruht dabei entweder auf dem Masse/Ladung- (MS) oder dem Form/Ladung-Verhältnis (IMS). Die IMS wird klassisch bei der Detektion von chemischen Kampfstoffen,

Sprengstoffen oder Drogen eingesetzt. Modernere Anwendungen sind die Lebensmittelüberwachung²⁶, Umweltanalytik²⁷, Prozessanalyse²⁸ und medizinische Verfahren^{29,30}. Die Vorteile der IMS liegen in einer hohen Sensitivität, kurzer Analysenzeit und geringem technischem Aufwand. Allerdings gestaltet sich die Analyse komplexer Gemische als schwierig, weshalb sie häufig mit anderen Techniken wie z.B. der Massenspektrometrie^{31,32} kombiniert wird. Diese wiederum stellt eine weitläufig etablierte Methode dar, die bei Routinemessungen mehrere tausend Spektren pro Tag erzeugen kann.²⁴ Interessante Anwendungen hierfür sind die Überwachung von Peptidsynthesen³³ oder Untersuchungen von Mikroorganismen^{34,35}.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen die Grundlage zur Entwicklung bzw. Etablierung analytischer Techniken in der Landwirtschaft bilden. Es handelte sich dabei um Arbeiten zur Charakterisierung der Untersuchungsobjekte sowie zur Parametrisierung geeigneter analytischer Verfahren. Konkrete Vorschläge zur großtechnischen Umsetzung waren nicht Bestandteil dieser Arbeit. Sie zeichnet sich hingegen dadurch aus, dass etablierte Analysemethoden mit modernen computergestützten Auswertungsverfahren aus dem Bereich der multivariaten Datenanalyse verknüpft werden, um damit hochkomplexe biologische Systeme zu analysieren.

In Übereinstimmung mit den Forderungen der Agenda 2030 sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dazu beitragen im Bereich Landwirtschaft ökonomische Verluste zu minimieren, die agrartechnische Produktivität zu steigern und umweltschonende Arbeitsmethoden zu etablieren.

2. Theorie

2.1. Material

2.1.1. Boden und Bodennährstoffe⁴

Der Mensch nutzt den Boden als Baugrund, für Forst- und Landwirtschaft, zur Abfalllagerung, als Rohstofflieferant (Ton, Sand, Kies, Kalk, Lehm usw.) und in Form von Grünflächen als Erholungsraum. Welche Form der Nutzung der jeweilige Standort erfährt, hängt von der Bewertung des Bodens ab. Diese beruht auf mehreren Faktoren, die sich auf die Bepflanzung des Standortes beziehen. Die Bodenleistung bezeichnet die Tragfähigkeit und das Puffervermögen des Bodens, d.h. was und wieviel auf diesem Boden wachsen kann. Die Belastbarkeit repräsentiert das Ausmaß der Veränderung der Bodeneigenschaften durch eine bestimmte Nutzung. Daraus ergibt sich eine Risikoabschätzung zum Erhalt der Nutzbarkeit. Diese Faktoren bestimmen die Eignung des Bodens für die jeweilige vorgesehene Anwendung, die entweder gut, schlecht oder nicht vorhanden sein kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Laserinduzierte Breakdown Spektroskopie (Kap. 2.2.1) genutzt, um Agrarböden zu analysieren. Dabei wurde das Augenmerk sowohl auf die physikochemischen Größen pH-Wert, Wassergehalt und Körnigkeit bzw. Partikelgröße als auch auf verschiedene im Boden enthaltene Nährstoffe gelegt.

Die Körnigkeit des Bodens bestimmt seine Porosität und damit sein Aufnahmevermögen für Wasser, Luft, Wurzeln und Bodentiere. Die Verhältnisse von Größe und Verteilung zwischen Gesteinsbruchstücken, Mineralpartikeln und Pflanzenteilen bestimmen diese Körnigkeit. Dementsprechend erfolgt eine Größenunterteilung der Körner in Blöcke (> 2 dm), Steine (> 63 mm), Kies (> 2 mm), Sand (> 63 µm), Schluff (> 2 µm) und Ton. Die Bestimmung der Partikelgröße kann entweder durch fraktionierte Siebung oder durch Sedimentation erfolgen. Letzteres bedeutet, dass die Sinkgeschwindigkeit v_s der Partikel in Wasser bestimmt wird (Glg. 1).⁴ Diese ist abhängig vom Partikelradius r , der Partikeldichte ρ_F , der Dichte ρ_W und Viskosität η von Wasser und der Fallbeschleunigung g . Während die Siebung für die Kies- und Sandfraktion verwendet wird, setzt man die Sedimentation zur Trennung der Schluff- und Tonfraktion ein. Allerdings gilt die dazu gehörige Gleichung 1 streng nur für kugelförmige Partikel. Ton ist dagegen vornehmlich aus Plättchen aufgebaut,^{36,37} weshalb hier der errechnete Partikelradius als Äquivalentradius bezeichnet wird.

$$v_s = \frac{2 \cdot r^2 \cdot (\rho_F - \rho_W) \cdot g}{9 \cdot \eta} \quad (1)$$

Der Wassergehalt des Bodens setzt sich aus zwei Anteilen zusammen. Die Bodenfeuchte ist der Anteil, der nach Eintrag einer beliebigen Wassermenge im Boden gespeichert wird, ohne als Oberflächenwasser abzufließen. Dieser Teil verdunstet mit der Zeit, bis eine Wassermenge erreicht ist, die im Verteilungsgleichgewicht mit dem angrenzenden Gasvolumen steht. Dieses nach Lufttrocknung zurückbleibende Volumen wird als Bodenwasser bezeichnet. Es wird üblicherweise durch Trocknen bei einer Temperatur von 105 °C über einen Zeitraum von 16 h entfernt. Der so erhaltene Boden wird als ofentrocken bezeichnet. Somit zählt eventuell in den Bodenpartikeln enthaltenes Kristallwasser

defacto nicht zum Wassergehalt des Bodens. Anzumerken ist hierbei, dass diese Einteilung nur eine Form möglicher Definitionen des Begriffes Bodenwasser bzw. Bodenfeuchte darstellt. Diese können je nach Kontext variieren.³⁸

Wieviel Wasser im Boden vorhanden ist, hängt vom Bodentyp, der Niederschlagsmenge, der durch Sonneneinstrahlung zugeführten Energie, der Bodenneigung, der Verdichtung des Bodens und der Hydrophilie enthaltener organischer Bestandteile ab.³⁸⁻⁴⁰ Ist der gesamte Porenraum mit Wasser gefüllt, so ist der Boden gesättigt. Der Wassergehalt des Bodens beeinflusst sowohl dessen mechanische, chemische und physikalische Eigenschaften wie auch die Biodiversität vorhandener Mikroorganismen und Pflanzen.³⁹

Die Bestimmung des Wassergehaltes erfolgt klassisch über gravimetrische oder volumetrische Verdampfung nach den oben genannten Parametern. Nur für Böden mit hohem Anteil an organischen Substanzen (Humus) wird der Gehalt durch Trocknung bei 65 °C bestimmt. Modernere Ansätze benutzen Techniken wie zum Beispiel Neutronenstreuung, Time-Domain-Reflectometry (TDR), Widerstandsmessungen, Bodenradar (ground penetrating radar, GPR) oder Messungen der Wärmekapazität der Bodens.³⁹

Die im Boden enthaltenen Nährstoffe werden in Makro- und Mikronährstoffe unterteilt, entsprechend ihrer Notwendigkeit für das Pflanzenwachstum. Zu den Makronährstoffen zählen Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Kalium, Calcium, Magnesium und Natrium. Mikronährstoffe sind Mangan, Eisen, Kupfer, Zink, Bor, Molybdän und Chlor.^{41,42}

Die Nährstoffe können sowohl als Salze vorliegen, als auch adsorbiert an der Oberfläche von Bodenpartikeln, in den Poren von Oxiden oder den Zwischenschichten von Tonmineralien. Sie kommen außerdem in Form mineralischer Verbindungen vor, sowie als Gitterbestandteile von Silikaten und Oxiden, oder in organischen Komplexen bzw. Verbindungen der Bodenbiomasse.

Der Nährstoffgehalt wird je nach Substanz in mg/kg oder g/kg angegeben. Aus diesem errechnet sich der Nährstoffvorrat durch Multiplikation mit der Lagerungsdichte und der Bezugstiefe. Dieser Wert wird in kg/ha angegeben. Für die Landwirtschaft entscheidend ist der Anteil an pflanzenverfügbaren Nährstoffen. Diese Bedingung ist nur gegeben, wenn das jeweilige Element als Salz gelöst im Bodenwasser vorliegt. Die Pflanzenverfügbarkeit ist abhängig vom Nährstoffvorrat, der Konzentration in Lösung, der Rate der abiotischen Transportmechanismen, der Aktivität der Bodenorganismen, die für die Umwandlung aus den ungelösten Formen verantwortlich sind und der Aufnahmeeffizienz der jeweiligen Pflanze. So kann z.B. Stickstoff, welcher in Form von Peptiden oder Proteinen vorliegt, durch die Prozesse der Mineralisierung und Nitrifizierung in Ammonium- und Nitrationen umgewandelt werden. Diese Vorgänge werden zumeist durch spezialisierte Bodenmikroorganismen wie zum Beispiel *Nitrosomonas spp.* oder *Nitrobakter spp.* umgesetzt.⁴²

Die genannten Mikroorganismen können die Nährstoffe auch in ihrer Biomasse speichern. So kann Stickstoff z.B. in Form von Peptidgruppen oder Aminosäuren bzw. Aminoazuckern vorliegen. Schwefel findet man als Sulfatester, Mono- und Disulfide, Thiole oder Sulfoxide. Phosphor kommt zum größten Teil in Form von Phosphatestern vor.

2.1.2. Schimmelpilze und Mykotoxine

Die Detektion von Schimmelpilz-Kontaminationen ist einer der beiden Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit. Schimmelpilze sind pflanzliche Mikroorganismen und gehören neben anderen Pilzen, Algen und Moosen zur Gruppe der sogenannten Thallophyten.¹¹ Diese Pflanzen zeichnen sich dadurch aus, dass sie keine Gliederung in Wurzel, Spross und Blatt besitzen, sondern Flechtwerke aus Zellfäden, auch Myzel genannt, ausbilden. Eine genaue Definition des Begriffes Schimmelpilz existiert nicht, da es sich hierbei um einen umgangssprachlichen Begriff handelt.¹¹ Allgemein werden solche Pilzarten darunter zusammengefasst, die sich u.a. durch ein sehr schnelles filamentöses Myzelwachstum, ubiquitäre Vorkommen, einen artspezifischen Sekundärmetabolismus sowie asexuelle Sporen auszeichnen und abgestorbenes organisches Material als Nahrung nutzen können. Man spricht dabei von saprophytischem Wachstum. Sekundärmetabolismus nennt man solche Stoffwechselprozesse, die nur unter günstigen Bedingungen stattfinden und als verschwenderisch bezeichnet werden können. Zu den Produkten solcher Prozesse zählen die sogenannten Mykotoxine,¹¹ die vielfältige Wirkungen auf andere Organismen aufweisen. Ihr Nutzen für die Pilze selbst ist weitestgehend ungeklärt.

Die für die Landwirtschaft relevanten Schimmelpilze lassen sich grob in Feld- und Lagerschädlinge unterteilen. Feldschädlinge befallen die Pflanzen während der Wachstums- und Reifephase und treten bei höherer Getreidefeuchtigkeit (> 20 %) auf.¹² Zu ihnen zählen die Gattungen *Alternaria* und *Fusarium* sowie einige *Penicilium*-Arten. Lagerschädlinge befallen die geernteten Getreidekörner meist bei einem Feuchtigkeitsgehalt von ca. 15 %. Zu dieser Gruppe gehören vornehmlich die Pilze der Gattung *Aspergillus* und einige *Penicilium*-Arten.¹² Welche Arten genau auftreten, ist von der herrschenden Feuchtigkeit und Temperatur abhängig. Die wichtigsten Übertragungswege der verschiedenen Pilzarten sind Sporenflug oder Transport durch Insekten sowie andere Arthropoden.⁴³ Kontaminiert werden meist die Fruchtstände der Pflanze oder ihre Wachstumszonen. Darunter ist besonders das Meristem am Sprossende aufgrund der dünneren Zellwände betroffen.⁴³ Zu erkennen ist das i.d.R. an Verfärbungen und flaumartigem Bewuchs.

Etwa 150 Substanzen sind als Mykotoxine klassifiziert.¹² Die in der Agrarwirtschaft bekanntesten sind Deoxynivalenol (DON), Zearaleon (ZEA), Ochratoxin A (OTA), Fumonisin und Aflatoxin. Letzteres verursacht z.B. Leberschäden, wirkt immunsuppressiv und ist sowohl mutagen als auch cancerogen. ZEA ist potentiell cancerogen und wirkt generell fortpflanzungsschädigend. OTA ist ebenfalls cancerogen, immunsuppressiv, teratogen und wirkt akut toxisch auf Nieren, Magen-Darm-Trakt, Leber und Lymphsystem.⁴⁴ Die Beseitigung dieser Substanzen funktioniert lediglich durch starke Säuren bzw. Basen sowie in gewissem Maß durch Extraktion oder Bestrahlung. Gegen Temperaturen sind die Mykotoxine deutlich beständiger als die Schimmelpilze. So ist z.B. DON bis etwas über 170 °C stabil und die verschiedenen Aflatoxine noch im Bereich von 240 bis 310 °C.¹²

In Bezug auf die Schimmelpilze lässt sich eine grobe Zuordnung der beim Menschen durch Exposition geschädigten Organe treffen.⁴⁵ So greifen Kontaminationen durch *Aspergillus* vor allem die Lunge an,⁴⁶ während *Fusarium* eher auf Haut und Augen wirkt. *Penicilium* wirkt auf die Atmungs- und Sinnesorgane sowie das Zentralnervensystem. Besonders gefährdete Personengruppen sind immungeschwächte Menschen, Transplantationspatienten, Allergiker, Asthmatiker, Personen mit Leberschäden sowie Kinder und ältere Menschen.^{45,47}

Wie bereits erwähnt ist die sicherste Bekämpfungsstrategie eine frühzeitige Erkennung und Entfernung kontaminierten Materials. Klassische Nachweisverfahren für Mykotoxine stützen sich auf die Extraktion der Substanzen mit anschließendem chromatographischen Nachweis. Hierbei werden

Dünnschichtchromatographie (thin layer chromatography, TLC), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC), Gaschromatographie (GC) oder die Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis, CE) verwendet.⁴⁸ Diese Methoden erfordern die Probenahme vor Ort mit anschließender Laboruntersuchung, was einen hohen Zeitaufwand bedeutet. Eine Alternative bietet der als ELISA bekannte Antikörper-Schnelltest,⁴⁸ der transportabel und einfach zu handhaben ist. Außerdem generiert er ein eindeutiges und spezifisches Antwortsignal. Nachteilig sind die aufwendige Herstellung der Testkits, die Notwendigkeit für jeden Analyten einen eigenen Antikörper zu finden bzw. zu entwickeln und der Umstand, dass jeder Test nur einmalig verwendbar ist. In der vorliegenden Arbeit wird ein anderer Ansatz zur Erkennung von Schimmelpilzkontaminationen beschrieben, der auf der Detektion ihrer flüchtigen Metabolite beruht.

Neben den genannten Risiken weisen Schimmelpilze auch positive Aspekte auf.¹² So bilden einige Schimmelpilze Aromastoffe und finden so in der Lebensmittelindustrie Verwendung wie zum Beispiel der Blauschimmel. Andere können zur Herstellung von Chemotherapeutika in der Krebsmedizin genutzt werden, z.B. das von *Sorangium cellulosum* stammende Epothilon oder verschiedene sekundäre Metabolite wie der als Rotschimmel bekannten *Monascus* spp.^{49,50} Weiterhin gibt es Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die Antibiotika darstellen, wie das 1928 von Alexander Fleming beschriebene Penicillin, das die Behandlung von Infektionskrankheiten revolutioniert hat.

2.2. Methoden

2.2.1. Laser-induzierte Breakdown Spektroskopie^{13,51}

Voraussetzung für eine orts aufgelöste Bearbeitung von Feldeböden (precision agriculture) ist eine genaue Kartierung der Bodeneigenschaften. Die Analyse von Bodenbestandteilen mittels Laser-induzierter Breakdown Spektroskopie (LIBS) ist dafür eine geeignete Methode. Dabei handelt es sich um eine Form der Elementanalyse, welche auf der vom Analyten emittierten elektromagnetischen Strahlung basiert. Grundsätzlich stellt LIBS eine destruktive Methode dar, wobei allerdings die verwendete Substanzmenge im Vergleich zu klassischen nasschemischen Aufschlussverfahren sehr gering ist.

Historie

Die Grundlagen für LIBS wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts gelegt. Niels Bohr erkannte 1913 Zusammenhänge zwischen der Struktur von Atomen und den von ihnen emittierten Spektrallinien. Einstein postulierte 1917 die Möglichkeit von stimulierter Strahlungsemission. Es folgten verschiedene Experimente zur Feinstruktur der Spektrallinien in den 1920er Jahren. 1958 beschrieben Schawlow und Townes erstmal das Prinzip des LASERs und zwei Jahre später wurde durch Maiman erstmalig eine auf Rubidium basierende Laserquelle in Betrieb genommen. 1962 präsentierten Breech und Cross eine erste Arbeit zur Laserablation und schließlich wurde 1983 durch Cremer und Radziemski der Begriff der Laser-induzierten Breakdown Spektroskopie geprägt.

Zum Verständnis der später beschriebenen Untersuchungen soll in den folgenden Abschnitten eine grundlegende Beschreibung der bei LIBS auftretenden Prozesse sowie eine kurze Behandlung der verwendeten Techniken vorgenommen werden.

Prinzip

Bei der Laser-induzierten Breakdown Spektroskopie wird eine Probe unter dem Einfluss eines fokussierten Laserstrahls verdampft und ionisiert (Abb. 1). In der entstehenden Plasmawolke befinden sich freie Elektronen und Ionen sowie angeregte Atome und Moleküle. Nach Ende des Laserpulses kühlt das Plasma ab, wobei die darin enthaltenen Teilchen relaxieren und/oder rekombinieren und dabei elektromagnetische Strahlung emittieren. Diese wird mit einem Spektrometer analysiert und zur Identifizierung der in der Probe vorhandenen Elemente herangezogen. Dabei entsteht zunächst ein kontinuierliches Spektrum aus Rekombinations- und Bremsstrahlung der Elektronen. Diese geht nach weniger als einer Mikrosekunde in ein Spektrum diskreter Linien über, welche auf die Relaxation einzelner Atome zurückzuführen sind. Anschließend lassen sich Banden beobachten, welche von Molekülen stammen.

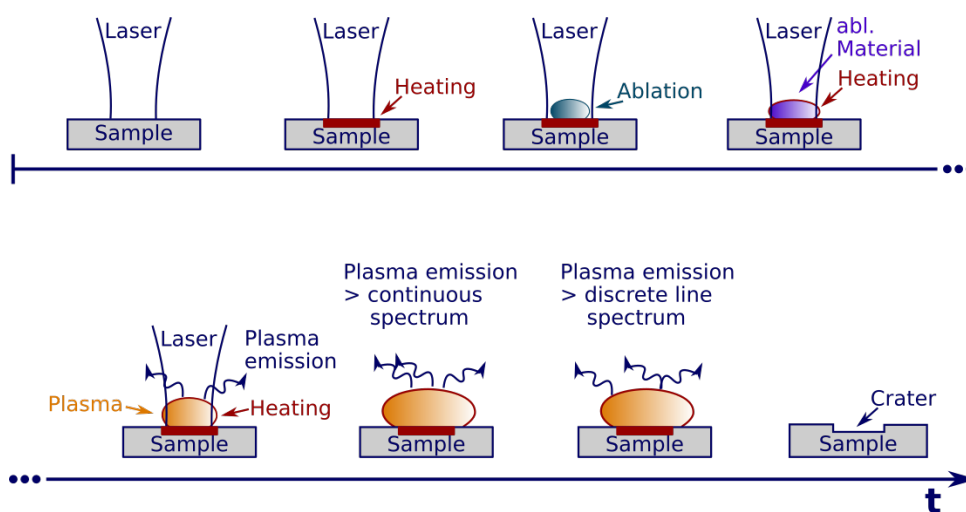


Abb. 1: Fließschema LIBS-Prozess; Fokussierung des Lasers auf eine Oberfläche, Entfernung und Aufheizen von Material bis zur Plasmabildung, Emission von Strahlung während der Ausbreitung und Abkühlung des Plasmas. (Graphik erstellt von Pia Brinkmann, Universität Potsdam)

Der auf der Probe zurückbleibende Krater hat je nach Material und Laserenergie einen Durchmesser von einigen Mikrometern bis wenigen Millimetern. Bei der Durchführung von LIBS-Messungen muss daher darauf geachtet werden, dass die Probe homogen ist, um ein repräsentatives Spektrum zu erhalten. Alternativ müssen viele Spektren an verschiedenen Punkten auf der Probenoberfläche aufgenommen werden. Diese bilden die Grundlage für statistische Auswertemethoden. Das LIBS-Experiment kann auch mit zwei direkt aufeinander folgenden Laserpulsen durchgeführt werden. Dabei kann die Strahlführung entweder orthogonal oder colinear erfolgen. Dieses Doppelpuls-LIBS-Verfahren zeichnet sich durch höhere Peakintensitäten und entsprechend bessere Nachweisgrenzen aus und wird häufig für die Untersuchung flüssiger bzw. gelöster Proben verwendet.⁵²

Breakdown und Plasma

Wird ein Laserstrahl auf eine Oberfläche oder in eine Matrix (Flüssigkeit, Gasvolumen) fokussiert, kann in Abhängigkeit von der hierbei erzeugten Energie ein als Breakdown bezeichneter Prozess auftreten. Dabei handelt es sich um eine spontane Bildung von geladenen und energetisch angeregten Partikeln. Dazu gehören freie Elektronen, Ionen und Atome. Die Summe dieser Teilchen wird als Plasma

bezeichnet, nicht zu verwechseln mit dem Materiezustand innerhalb von Sternen, wo die Drücke und Temperaturen viele Größenordnungen höher liegen.⁵³ In diesem Plasma finden sowohl Absorptions- als auch Emissionsvorgänge statt. Diese sind abhängig von der Plasmatemperatur und Art der enthaltenen Partikel. Der für den Breakdown nötige Schwellenwert der Laserleistung liegt bei etwa 10^{11} W/cm^3 .

Eine feste Oberfläche wird zunächst durch den Laser lokal stark aufgeheizt, was zum Schmelzen und/oder Verdampfen dieser führt. Das in die Gasphase überführte Material wird im Folgenden ionisiert. Dies erfolgt in zwei Phasen: der Initialionisation und einer anschließenden Kaskade. Der erste Schritt kann dabei zum Beispiel durch Multiphotonenanregung über virtuelle oder resonante Energieniveaus stattfinden. Alternativ kann eine Einzelphotonenionisation thermisch angeregter Teilchen oder von Spezies mit geringerer Ionisationsenergie erfolgen. Anschließend werden die bei der Initialionisation freigesetzten Elektronen mit anderen Atomen/Molekülen kollidieren und ihre kinetische Energie teilweise abgeben, was zur Freisetzung weitere Elektronen führt. Den Energieverlust können die Elektronen durch Absorption weiterer Strahlung kompensieren,¹³ womit die Ionisationskaskade aufrechterhalten wird, solange der Laser auf die Probe wirkt. Diese weitere Absorption wird z.B. durch den Prozess der inversen Bremsstrahlung⁵⁴ oder durch Anregung einer Elektronenoszillation im freien Raum ablaufen. Auf die Oberfläche wirkt die im Plasma auftretende Absorption abschirmend gegenüber dem Laser, was die Ablation verringert. Allerdings kann die hohe Temperatur des Plasmas dazu führen es auch nach dem Ende des Laserpulses auf der Oberfläche zu weiterer Verdampfung kommt.

Der Grad der Ionisation in einem bestimmten Bereich der Plasmawolke ist abhängig von der zeitlichen und räumlichen Differenz zum Ursprungspunkt des Plasmas, wobei zunächst Elektronen und Ionen zu beobachten sind, gefolgt von angeregten Atomen und schließlich Molekülen. Übergreifend hängt der Ionisationsgrad von der Plasmatemperatur ab. Diese wird ihrerseits von der Intensität und Pulsdauer des Lasers bestimmt und nimmt vom Zentrum zu den Randbereichen des Plasmas ab. Zur Bestimmung der Plasmatemperatur betrachtet man ausgewählte Spektrallinien bzw. deren Intensitätsverhältnisse. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten der Linienauswahl. Entweder werden die Linien einer neutralen und einer ionisierten Form derselben Spezies verglichen, oder man verwendet nur Linien von neutralen Teilchen. Die Grundlage für die Temperaturberechnung bilden die Verhältnisse der Besetzungsdichten verschiedener Energieniveaus. Diese können für angeregte Zustände durch die Boltzmann-Gleichung und für unterschiedliche Ionisationsgrade durch die Saha-Gleichung beschrieben werden.^{13,55} Kombiniert man diese beiden Ansätze und bezieht die Emissionsintensitäten mit ein, so erhält man den sogenannten Saha-Boltzmann-Plot (Glg. 2).

$$\ln \left(\frac{\epsilon_{ji}^z \cdot \lambda_{ji}}{A_{ji}^z \cdot g_j^z} \right) - z \ln \left[2 \left(\frac{m_e k_B}{2\pi h^2} \right)^{3/2} \cdot \frac{T^{3/2}}{N_e} \right] = - \frac{1}{k_B T} E_j^z + \sum_{k=0}^{z-1} (E_\infty^k - \Delta E_\infty^k) + \ln \left(\frac{hc N^0}{Q^0(T)} \right) \quad (2)$$

Hier ist ϵ die Emission (bzw. Intensität), λ die Wellenlänge, A die Übergangswahrscheinlichkeit, E und g sind die Energie und Entartung des angeregten Zustandes. m_e ist Elektronenmasse, k_B die Boltzmann-Konstante, h die Planck-Konstante, c die Lichtgeschwindigkeit und N_e die Elektronendichte. Q^0 und N^0 sind die Zustandssumme und die Population der neutralen Spezies, j und i stehen für den betrachteten Übergang und die Position im Plasma. z ist die Ladungszahl und T die gesuchte Temperatur.

Der Saha-Boltzmann-Plot lässt sich als lineare Auftragung des Emissionsabhängigen Terms von der Energie des zu dem entsprechenden Übergang gehörenden angeregten Zustandes darstellen. Der Anstieg dieser Geraden enthält dann die Plasmatemperatur. Allerdings ist diese auch im Emissionsterm enthalten, weshalb die Berechnung iterativ erfolgen muss. Die meisten der verwendeten Variablen können aus entsprechenden Tabellenwerken entnommen werden, entsprechend der betrachteten Wellenlängen. Die Elektronendichte wird über die Stark-Verbreiterung der Emissionslinien bestimmt. Der Plot wird an die oben genannte Linienauswahl angepasst. Bei der Verwendung von neutralen und ionischen Spezies bleibt die Gleichung wie beschrieben erhalten. Werden nur neutrale Teilchen betrachtet so verkürzt sich der Ausdruck, da die Terme, welche die Ladungszahl enthalten, eliminiert werden. Letzteres entspricht der Boltzmann-Gleichung.

Bei der Bestimmung der Plasmatemperatur müssen außerdem folgende Aspekte berücksichtigt werden. Die Temperatur ändert sich sowohl im zeitlichen als auch im räumlichen Verlauf der Plasmaausbreitung. Effekte wie die Selbstabsorption wirken sich verschieden auf die Emissionslinien von Neutralteilchen und Ionen aus. Anregung, Ionisierung und Elektronenbewegung tragen in unterschiedlichem Maß zur Plasmatemperatur bei. Diese Effekte tragen zum Fehler der Temperaturbestimmung bei. Eine Methode zur Adressierung dieser Probleme ist z.B. die Abel-Inversion, bei welcher eine räumliche Kartierung der Plasmaeigenschaften erfolgt.

Für diese Art der Temperaturbestimmung werden vorrangig Linien mit hoher Intensität benutzt, wie z.B. die des einfach geladenen und ungeladenen Calciums ($\text{Ca II} = 393.3 \text{ nm}$, $\text{Ca I} = 422.6 \text{ nm}$) oder die Linien der Balmer-Serie von Wasserstoff.

Neben dem Ionisationsgrad bestimmt die Plasmatemperatur auch die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit der Ionisation im Plasma, das Ausmaß der Ablation von Oberflächenmaterial und die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Plasmawolke.

Diese Ausbreitung des Plasmas hängt darüber hinaus von der Beschaffenheit der Probe ab. In einer gasförmigen oder flüssigen Matrix wird es sich zunächst als Detonationswelle entgegen dem einfallenden Laserstrahl ausbreiten. Nach Ende des Pulses erfolgt dies dann gleichmäßig in alle Raumrichtungen. Auf einer Oberfläche wird sich das Plasma am schnellsten senkrecht dazu bewegen. Darüber hinaus ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit abhängig von der Masse und Energie des Plasmamaterials sowie der Beschaffenheit des umgebenden Gases.

Neben den genannten Teilchen können nach dem Ende des Laserpulses noch größere Partikel auftreten. Nanopartikel bilden sich durch Kondensationsprozesse im abkühlenden Plasma. Starke Druckgradienten zwischen Plasma und Umgebung führen zur Entstehung von Flüssigkeitstropfen. Der durch hohen Druck und Temperatur verursachte Stress auf die Probenoberfläche bewirkt das Herausschleudern von Bruchstücken.

Emissionsspektren

Nach dem Laserpuls beginnt das sich ausbreitende Plasma abzukühlen. Dabei gehen angeregte Spezies in ihren energetischen Grundzustand über und geladene Teilchen können rekombinieren. Diese Prozesse setzen elektromagnetische Strahlung frei, wobei diese Emissionen spontan erfolgen aber auch induziert werden können. Abhängig von den elektronischen Zuständen des Atoms oder Moleküls entstehen charakteristische Muster von Spektrallinien und -banden, welche zur Identifizierung der entsprechenden Substanzen genutzt werden. Dabei entstehen die Linien aus den Übergängen zwischen diskreten Energieniveaus einzelner Atome während Banden bei Molekülen auftreten.

Übergänge zwischen diskreten Niveaus und dem Ionisationskontinuum bzw. innerhalb dessen werden als free-bond- (strahlende Rekombination) und free-free-transitions (Bremsstrahlung) bezeichnet. Diese verursachen eine kontinuierliche Emission, welche besonders am Beginn der Plasmalebensdauer dominant ist.

Die Intensität der Emissionslinien hängt von der Übergangswahrscheinlichkeit zwischen den beteiligten Zuständen sowie verschiedenen Rahmenbedingungen ab. Dazu gehören resonante Übergänge, metastabile Energieniveaus, Reabsorptionseffekte, die Geschwindigkeit des Energieaustausches zwischen verschiedenen Atomen bzw. zwischen Atomen und Elektronen und die Möglichkeit der Strahlungsabsorption in den äußeren, kalten Bereichen des Plasmas.

Zur Breite der Spektrallinien (und damit der Auflösung im Spektrum) tragen Effekte wie die natürliche Linienbreite und die Dopplerverbreiterung bei. Letztere wird durch die statistische thermische Bewegung der Teilchen verursacht. Hierbei tritt ein hypsochromer bzw. bathochromer Effekt auf, wenn die Translation des emittierenden Teilchens in Richtung bzw. in Gegenrichtung der Emission erfolgt. Da die Bewegung alle Raumrichtungen einschließen kann, resultiert für die Dopplerverbreiterung ein Gauß-förmiges Profil.

In der Plasmaphase tritt zudem sehr dominant der Effekt der Starkverbreiterung auf. Hier werden durch die Anwesenheit der elektrischen Felder anderer Ionen oder Elektronen die Energiezustände des betroffenen Atoms verschoben und aufgespalten. Dabei ist das Ausmaß dieser Veränderung proportional zur Stärke des beeinflussenden elektrischen Feldes und dem Abstand zu diesem. Allerdings liegt nur für das Wasserstoffatom eine eindeutige direkte Proportionalität vor. Für alle anderen Atome geht der Einfluss des elektrischen Feldes mit der zweiten Potenz seiner Feldstärke ein. Man unterscheidet demnach zwischen dem linearen und quadratischen Stark-Effekt.

Die Spektralbanden der free-bond-Übergänge sind abhängig von der Ionisierungsenergie des Atoms oder Moleküls und der kinetischen Energie der interagierenden Elektronen. Free-free-Übergänge liegen dem Phänomen der Bremsstrahlung zugrunde. Diese entsteht wenn ein Elektron beim Durchqueren des elektrischen Feldes eines Ions eine Richtungsänderung und damit einen Verlust an kinetischer Energie erfährt.

Detektion

Die Detektion der Spektrallinien erfolgt bei der LIBS häufig durch sogenannte CCD- bzw. ICCD-Chips. CCDs (charge-coupled devices) bestehen aus einer zweidimensionalen Anordnung von Kondensatoren, die ihrerseits aus Metall, Isolator und Halbleiter aufgebaut sind. Sie können Informations-bits bzw. Pixel in Form von Elektronenpaketen speichern. Diese Elektronen werden durch auftreffende Photonen freigesetzt und können durch eine entsprechend angelegte Spannung die Potentialbarriere zwischen den Kondensatoren überwinden und so von einer Zelle zur nächsten transportiert werden. Werden diese Spannungstore systematisch geöffnet, so erfolgt ein zeilenartiges Auslesen der gespeicherten Informationen. Bei einer ICCD (intensified CCD) wird noch ein so genannter Mikrokanalplatten-Photonenvervielfacher (micro channel plate photomultiplier, MCP-PMT) genutzt, der die Photonendichte erhöht und somit größere Peakintensitäten hervorruft. Allerdings entsteht auch mehr Rauschen und es können Unschärfen im Bild auftreten. Eine ICCD eignet sich vornehmlich für zeitaufgelöste Messungen, da der Verstärker gepulst arbeitet und mit einer Genauigkeit von 5 ns angesteuert werden kann.

Bei der Arbeit mit (I)CCDs ist darauf zu achten, dass das Gerät gekühlt wird (z.B. mit einem Peltier-Element), um den so genannten Dunkelstrom (dark current) zu verringern. Dabei handelt es sich um Elektronen die spontan freigesetzt werden, obwohl kein Photon aufgetroffen ist. Ursache sind thermisch bedingte Wechselwirkungen zwischen den Atomen der Zelle, besonders bei den Halbleitern welche funktionsbedingt „Unreinheiten bzw. Fehler“ in ihrer Kristallstruktur aufweisen.

LIBS als Handgerät

Als schnelle Multielementanalyse ohne aufwendige Probenvorbereitung ist die LIBS potentiell für den Einsatz als mobile Vor-Ort-Analytik geeignet. Die grundlegenden Anforderungen an ein mobiles Analysegerät sind vielfältig. Sämtliche Komponenten müssen miniaturisiert werden, um das Gerät transportabel zu gestalten, insbesondere bei einem Einsatz als Handheld. Es muss eine ausreichend hohe Laufzeit unabhängig von externen Energie- und Verbrauchsmittelquellen besitzen, um einen mehrstündigen Einsatz vor Ort zu gewährleisten. Die Handhabung muss möglichst simpel und sicher sein, damit auch fachfremde Anwender damit arbeiten können. Dementsprechend muss die Ausgabe der Messergebnisse in einer allgemein interpretierbaren Form erfolgen und die aufgenommenen Daten müssen in gängigen Formaten exportiert werden können. Zudem muss das Gerät robust genug für den Einsatz im Feld sein und dennoch eine mit Laborgeräten vergleichbare Analysenleistung besitzen.

Bei der Laser-induzierte Breakdown Spektroskopie werden bereits seit mehreren Jahren erfolgreich Handheld-Geräte verwendet, welche diese Voraussetzungen erfüllen. Diese beinhalten Mikrochip-Laser und Breitbandspektrometer und kommen z.B. bei geologischen und geochemischen Untersuchungen zum Einsatz.

2.2.2. Ionenmobilitätsspektrometrie²⁵

Flüchtige Substanzen, die ihren Ursprung in biologischen Systemen haben, stellen eine besondere analytische Herausforderung dar. Sie treten als komplexe Gemische auf, deren Bestandteile häufig geringe Konzentrationen besitzen. Ihre quantitative Zusammensetzung ist variabel in Abhängigkeit des Zustandes der ursprünglichen Systems.

Die Detektion dieser Substanzen erfordert eine schnelle, empfindliche Analyse welche nach Möglichkeit vor Ort erfolgen sollte, um drastische Veränderungen des Systems zu vermeiden. Eine aufwendige Probenvorbereitung ist damit nicht gegeben. Im Idealfall werden die Analyten direkt aus dem Gasvolumen über der biologischen Probe entnommen.

Eine analytische Methode, welche diese Anforderungen erfüllt, ist die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS). Hierbei werden ionisierte Analyten entsprechend ihrer Wechselwirkungen mit anderen Teilchen voneinander getrennt. Die Analysenzeit beträgt in der Regel wenige Millisekunden. Die Vielfalt der nachweisbaren Substanzen richtet sich nach der verwendeten Ionisationsmethode. Die untersuchten Proben können dementsprechend sowohl in festem, flüssigen bzw. gelöstem oder gasförmigen Zustand vorliegen. Die Empfindlichkeit der Analyse ist vergleichbar mit der Massenspektrometrie. IM-Spektrometer können leicht miniaturisiert werden und sind somit für Vor-Ort-Analysen gut geeignet. Die Einsatzgebiete der IMS umfassen Sicherheitstechnik, Prozessanalytik, Untersuchungen im Lebensmittel- und medizinischen Bereich, Umweltanalysen bis hin zur Anwendung in der Raumfahrt.

Historie

Der Grundstein für die IMS wurde bereits zum Ende des 19. Jahrhunderts gelegt. Man entdeckte, dass unter Einfluss elektromagnetischer Wellen aus dem Bereich der ultravioletten Strahlung (UV) und Röntgenstrahlung (X-ray) Ionen in der Gasphase gebildet werden können. Auch Radioaktivität oder elektrische Entladungen wurden als ionisierend beschrieben. Es folgten verschiedene Studien zur Beweglichkeit von Gasionen in elektrischen Feldern sowie zum Einfluss verschiedener Umweltbedingungen (Druck, Temperatur, Feuchtigkeit) auf diese Bewegung.

Langevin beschrieb in den Jahren 1903 bis 1905 die Wechselwirkungen von geladenen und neutralen Teilchen als effektiven Stoßquerschnitt und ihren Einfluss auf die Mobilität. 1936 wurde erstmals das Bradbury-Nielson-Ionentor als Trennung zwischen Reaktionsraum und Driftraum präsentiert. 1938 wurden erstmals Hochfeldmobilitäten beschrieben und damit eine Abhängigkeit der Mobilität vom elektrischen Feld.

Zum Ende der 1960er Jahre begann die Nutzung der IMS im Militärbereich zur Detektion von Sprengstoffen und chemischen Kampfstoffen. Und in den 1970er Jahren setzte sich das moderne Driftröhrendesign, bestehend aus einem geschlossenen Zylinder mit gerichtetem Gasfluss, durch. Dies ermöglichte nicht nur reproduzierbare Messungen bei gleichzeitiger Vermeidung von Clusterbildungen, sondern auch erste Kopplungen von Niederdruck-IM-Geräten mit Massenspektrometern.

1973 folgte die erste Kopplung eines Gaschromatographen mit einem IM-Spektrometer und 1976 wurde erstmals ein Atmosphärendruck-IM-Spektrometer mit einem Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt. 1984 wurde die Elektrospray-Ionisation als Ionenquelle für die IMS eingeführt und erlaubte so den direkten Zugang zu flüssigen und gelösten Analyten. Im Jahr 2002 wurde schließlich ein als „Volatile Organic Analyser“ bezeichnetes IM-Spektrometer auf der internationalen Raumstation ISS zur Überwachung der Luftqualität eingesetzt.

Prinzip

Der Begriff Ionenmobilitätsspektrometrie bezeichnet alle Methoden zur Charakterisierung ionisierter Substanzen anhand ihrer durch ein elektrisches Feld hervorgerufenen Bewegungsgeschwindigkeit in einem definierten Gasvolumen. In diesem Volumen bewegt sich der Ionenschwarm durch ein elektrisch neutrales Gas, welches Driftgas genannt wird und in der Regel in Gegenrichtung zum Ionenschwarm fließt.

Realisiert wird dieses Konzept durch einen zylinderförmigen Aufbau, der aus zwei räumlich getrennten Bereichen besteht (Abb. 2), dem sogenannten Ionisations- oder Reaktionsraum und dem Driftraum. Der Zylinder ist aus einer Abfolge von ringförmigen Elektroden und Isolatoren aufgebaut. Hier wird eine linear abfallende Spannungskaskade angelegt, welche im Innenraum des Zylinders ein gleichmäßiges elektrisches Feld erzeugt. Die Trennung der beiden Räume erfolgt meist durch ein Ionentor. Dabei handelt es sich um ein Bauteil, welches durch eine Sperrspannung die Bewegung der Ionen vom Reaktionsraum in den Driftraum verhindern kann. Die heute bekannteste Bauweise dafür ist das Bradbury-Nielson-Gate.

Ein Ionentor kommt dann zum Einsatz, wenn die Erzeugung der Ionen im Reaktionsraum kontinuierlich erfolgt, wie zum Beispiel bei der sogenannten chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionization, APCI). Dann wird die Öffnung des Tores als Startzeitpunkt

für die Messung der Driftgeschwindigkeit verwendet. Bei anderen Ionisierungsmethoden, welche die Ionen in definierten Zeiträumen erzeugen, werden diese als Startsignal für die Messung genutzt. Eine solche Methode stellt zum Beispiel die resonanzverstärkte Mehrphotonenionisation (resonance enhanced multiphoton ionization, REMPI) dar, bei welcher der zur Ionisation verwendete Laserpuls den Beginn der Driftzeitmessung kennzeichnet. Am Ende der Driftstrecke befindet sich der Detektor. In der Regel handelt es sich dabei um eine Faraday-Platte, mit der die Zahl der auftreffenden Ladungen pro Zeiteinheit bestimmt wird. Je nach Anwendung werden verschiedene Feldstärken, Temperaturen oder Drücke für die Messungen verwendet.

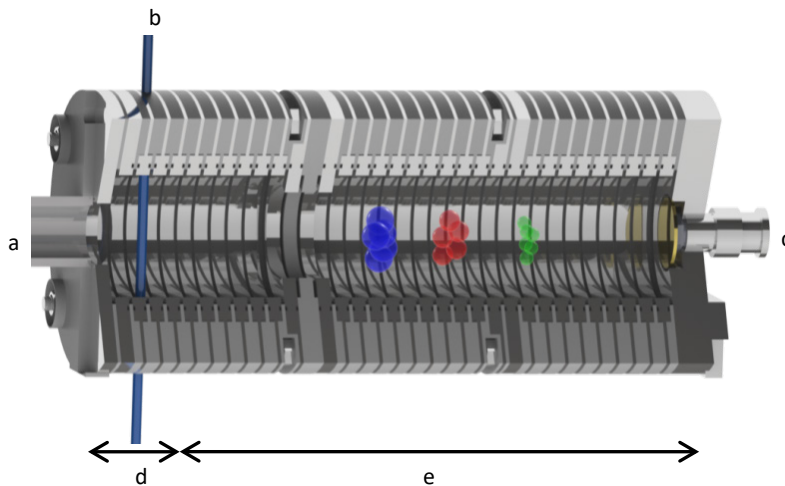


Abb. 2: Schema eines Driftröhren-IM-Spektrometers; a) Gasauslass, b) Ionenquelle Laser, c) Faradaydetektor und Verstärkeranschluss, d) Reaktions-/Ionisationsraum, e) Driftraum

Auch die Nutzung unterschiedlicher Driftgase oder das Hinzufügen von definierten Substanzzusätzen zum Driftgas ist möglich. Die Probenezufuhr kann über einen Direkteinlass, über Thermodesorption bzw. Verdampfer oder vorangeschaltete Trennsäulen (GC, HPLC) erfolgen. Häufig verfügen kommerzielle Geräte über Barrieren am Probeneinlass wie Filter oder Membranen, um einen undefinierten Wassereintrag oder Verunreinigungen des Spektrometers durch makroskopische Partikel zu vermeiden.

Beim Durchqueren der Driftstrecke kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Ionen und den Neutralmolekülen, welche im Zusammenspiel mit dem angelegten elektrischen Feld die mittlere Geschwindigkeit der Ionen bestimmen. Diese Wechselwirkungen sind unter anderem abhängig von der Art der beteiligten Ionen. Aufgrund dessen kommt es während der Bewegung des Ionenschwarms entlang der Driftstrecke zur Trennung der verschiedenen Ionensorten, da jede eine andere mittlere Wanderungsgeschwindigkeit besitzt.

Da die Bewegung einzelner Ionen im Schwarm nicht nur auf dem E-Feld beruht, sondern auch auf einer Diffusion entlang des räumlichen Konzentrationsgradienten sowie auf Coulomb-Abstoßung gleich geladener Ionen, besitzen die zu den jeweiligen Ionensorten gehörenden Signale (IM-Peaks) eine meist gaußförmige Peakform.

Driftgeschwindigkeit und Mobilität

Die Driftgeschwindigkeit v_D wird grundlegend durch ihre Abhängigkeit von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes E beschrieben (Glg. 3). Hierbei ist K ein Proportionalitätsfaktor, der als Ionenmobilität bezeichnet wird. In diese Größe fließen unter anderem die bereits erwähnten Ion-Neutral-Wechselwirkungen ein, weshalb die Mobilität für eine gegebene Ion-Driftgas-Kombination charakteristisch ist.

$$v_D = K \cdot E \quad (3)$$

Allerdings besteht auch eine Abhängigkeit der Mobilität von den Zustandsgrößen Druck und Temperatur. Zum Vergleich verschiedener Messungen wird deshalb die sogenannte reduzierte Mobilität verwendet (Glg. 4). Hierbei wird die Mobilität auf einen Druck von 101.3 kPa und eine Temperatur von 273 K normiert. Allerdings verläuft die Abhängigkeit der Mobilität von Druck (p) und Temperatur (T) nicht linear, weshalb die Verwendung von K_0 streng genommen nur innerhalb kleiner T - bzw. p -Bereiche korrekt ist.

$$K_0 = K \cdot \frac{273 \text{ K}}{T} \cdot \frac{p}{101.3 \text{ kPa}} \quad (4)$$

Zudem wird die Druckabhängigkeit der Mobilität durch die Stärke des angelegten elektrischen Feldes beeinflusst. Dieser Einfluss wird in Form des Verhältnisses von Feldstärke und Teilchendichte (E/N) ausgedrückt und allgemein durch eine Auftragung von K_0 über diesem Verhältnis dargestellt. Letzteres wird in der Einheit Townsend (Td) angegeben, wofür Gleichung 5 gilt.

$$1 \text{ Td} = \frac{E}{N} \cdot 10^{17} \text{ V} \cdot \text{cm}^2 \quad (5)$$

Mason-Gleichung und Wechselwirkungsmodelle

Die Ionenmobilität wird durch die Revercomb-Mason-Gleichung (Glg. 6) beschrieben. Neben (effektiver) Temperatur T und Druck p (bzw. Teilchendichte N) beinhaltet diese auch die Ladungszahl q der Ionen, die reduzierte Masse $\mu = f(m, m_N)$ der interagierenden Teilchen.

Die entscheidende Größe ist jedoch der sogenannte Stoßquerschnitt Ω_D , welcher die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen den Ionen und den neutralen Gasteilchen beschreibt.

$$K = \frac{1}{3^{1/2}} \frac{q}{N} \cdot \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{m_N} \right)^{1/2} \cdot \frac{1}{(k_B T)^{1/2}} \cdot \frac{1}{\Omega_D} \quad (6)$$

Eine vereinfachte Herleitung dieser Gleichung ist in der 1975 von Revercomb und Mason veröffentlichten Arbeit zu finden⁵⁶. Im Zuge dieser wurden verschiedene Annahmen bzw. Vereinfachungen zu den betrachteten physikalischen Zusammenhängen vorgenommen. So geht man z.B. davon aus, dass nur binäre Stöße zwischen den Ionen und Neutralteilchen stattfinden. Dafür muss die mittlere freie Weglänge der Ionen deutlich größer sein als die Reichweite der zwischen zwei Stoßpartnern auftretenden Wechselwirkungen. Außerdem wird vorausgesetzt, dass ein Ion höchstens

mit einem Neutramolekül kollidiert und Kollisionen zwischen Ionen nicht stattfinden. Diese Voraussetzungen sind streng genommen nur gegeben, wenn man kleine Ionen in geringer Konzentration betrachtet.

Zur Beschreibung des Stoßquerschnittes Ω_D existieren verschiedene theoretische Modelle wie z.B. das Hartkugelmodell, das Polarisierungs-Modell und das 12,4-Potential-Modell. Diese unterscheiden sich in der Betrachtung der Ion-Neutral-Wechselwirkungen und beinhalten beispielsweise Streueffekte, permanente oder induzierte Dipole bzw. Quadrupole oder Van-der-Waals-Kräfte.

IM-Spektrum

Wie bereits gezeigt, stellt die Mobilität eine stoffspezifische Eigenschaft dar. Diese Größe kann allerdings nicht direkt gemessen werden, sondern wird aus der Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten im elektrischen Feld berechnet. Bei klassischen Driftzeit-Ionenmobilitätsspektrometern erfolgt dies anhand der Zeit t_D , welche die Ionen für das Zurücklegen einer definierten Strecke l bei konstanter Feldstärke E benötigen (Glg. 7). Üblicherweise liegt diese im Bereich von einigen Millisekunden. Dabei können in einer Driftröhre entweder Kationen oder Anionen nachgewiesen werden. Um diese Driftzeit messen zu können, benötigt man einen bekannten Startzeitpunkt. Dafür muss entweder die Bildung der Ionen im Reaktionsraum zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgen, oder der Übergang der Ionen in den Driftraum muss kontrolliert werden.

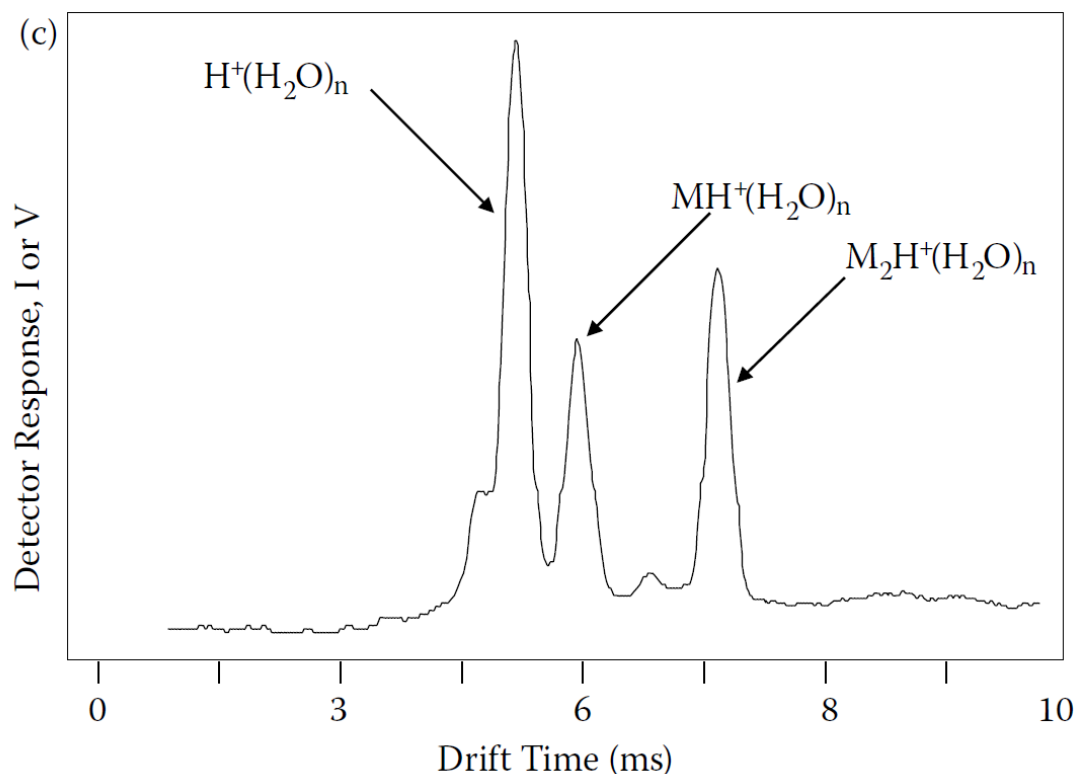


Abb. 3: IM-Spektrum (positiver Modus) von 2-Pentanon in Luft mit Reaktantionen-Peak $H^+(H_2O)_n$, protoniertem Monomer $MH^+(H_2O)_n$ und protoniertem Dimer $M_2H^+(H_2O)_n$ (Quelle: Eiceman et.al., Ion mobility spectrometry, third edition, Figure 1.2)²⁵

$$K = \frac{v_D}{E} = \frac{I}{E} \cdot \frac{1}{t_D} \quad (7)$$

Die graphische Darstellung der Messung erfolgt anhand eines IM-Spektrums (Abb. 3), in welchem die Zahl der am Detektor auftreffenden Ladungen als Peakintensität I über der Driftzeit t_D aufgetragen ist. Bei genügend hohem Auflösungsvermögen R_p repräsentiert jeder Peak eine Ionenspezies, wobei der Begriff Auflösungsvermögen hier als Quotient von Driftzeit des Peakmaximums und Halbwertsbreite (fwhm) des Peaks definiert ist. Je nach verwendeter Ionisationsmethode können auch Peaks auftreten ohne dass ein Analyt vorhanden ist. Diese sind meist bei geringen Driftzeiten zu sehen und stammen aus Zwischenschritten des Ionisationsprozesses. Sie werden als Reaktantionen-Peaks (RIP) bezeichnet.

Neben dem genannten Auflösungsvermögen R_p wird auch die Auflösung R verwendet, welche sich nach Gleichung 8 ergibt. Hierbei sind t_i die Driftzeiten zweier benachbarter Peaks, w_i ihre Peakbreiten und α die Trennleistung des Spektrometers, berechnet aus dem Quotienten von t_2 und t_1 . Aus dieser Gleichung folgt, dass bei $R = 1$ eine zweiprozentige Überlappung der Peaks gegeben ist. Andererseits benötigt man bei einer Trennleistung von einem Prozent ($\alpha = 1.01$) ein Auflösungsvermögen von $R_p = 174$ um diese Analyten zu trennen.

$$R = \frac{2(t_{D2} - t_{D1})}{w_2 + w_1} = \frac{R_p}{1.74} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \quad (8)$$

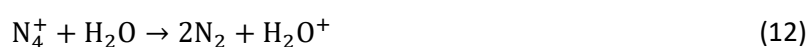
Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Güte eines Messverfahrens ist die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD). Dabei handelt es sich in erster Näherung um die kleinste Konzentration eines Analyten, bei welcher dessen Peak noch vom Hintergrundrauschen des Spektrums unterscheidbar ist. In der Regel wird dafür mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von $S/N > 3$ gearbeitet. Genauere Berechnungen des LOD erfolgen über die Kalibriergerade einer entsprechenden Standard-Konzentrationsreihe. Aufgrund der hohen Vielfalt möglicher Berechnungsmethoden wird hier auf eine Ausführung dieser verzichtet. In der IMS wird der LOD meist in den Einheiten ppm, ppb, mg/m^3 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$, pg/sample oder ng/sample angegeben. Hierbei ist insbesondere bei kommerziellen mobilen Geräten zu beachten, dass diese häufig einen Membraneinlass für die Probenzufuhr besitzen. Das hat zur Folge, dass nur etwa ein bis zehn Prozent der Analyten tatsächlich im Spektrometer analysiert werden. Ist darüber hinaus eine Kopplung zu einem Gaschromatographen vorhanden, so bestimmt dessen Split-Injektor die Analytmenge. Einen Einfluss auf den LOD kann auch die Wahl der verwendeten Ionisationsmethode haben. So können beispielsweise Substanzen, die beim APCI-Prozess aufgrund geringer Protonenaffinität einen schlechten LOD aufweisen, durch REMPI gut nachgewiesen werden, wenn die verwendete Anregungswellenlänge mit ihrem Absorptionsmaximum übereinstimmt.

Weitere Bewertungskriterien sind die Reproduzierbarkeit sowie die Sensitivität der Messungen. Erstere wird in der Regel anhand der Standardabweichung der Peakflächen über mehrere Messungen ermittelt. Letztere stellt den linearen Bereich des Anstiegs der Signalintensität mit den Peakflächen dar, was bei der IMS in den meisten Fällen ein bis zwei Konzentrationsgrößenordnungen beträgt.

Ionisationsmethoden

Um die zuvor beschriebenen Driftzeiten bestimmen und daraus die Mobilitäten der Analyten berechnen zu können, müssen diese als Ionen vorliegen. Die Erzeugung von Ionen kann auf vielen verschiedenen Wegen erfolgen, z.B. durch Beschuss eines Moleküls mit hochenergetischen Teilchen (Electron Impact, Fast Atom Bombardement u.a.) oder elektromagnetischer Strahlung (γ -Ray, x-Ray, UV), oder auch durch Ladungstransferreaktionen. Im Gegensatz zur Massenspektrometrie ist bei der Auswahl einer für die Ionenmobilitätsspektrometrie geeigneten Methode jedoch darauf zu achten, dass es sich um eine sogenannte sanfte Ionisation handelt. Das heißt, die Analytmoleküle dürfen durch den Prozess der Ionisation nicht zerstört werden.

Eine klassische Methode, die vor allem bei kommerziellen Geräten im Bereich der Sicherheitstechnik zum Einsatz kommt, ist die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI) auf Grundlage radioaktiver Strahlung. Der Prozess beginnt mit der Ionisation von Driftgasmolekülen (Glg. 9, 10). Bei kommerziellen Geräten wird häufig der β -Strahler ^{63}Ni (Glg. 9) verwendet.



Dieser als Beschichtung auf Goldfolie eingesetzte Strahler setzt Elektronen frei mit einer mittleren Energie von 17 keV und einer effektiven Reichweite in Luft von 10 bis 15 mm. Die so gebildeten Gasionen durchlaufen eine Kaskade von Ladungstransferreaktionen (Glg. 11 bis Glg. 15) an deren Ende Protonen stehen, welche als stabile Wassercluster vorliegen. Diese Reaktantionen übertragen ihre Ladung auf die Analytmoleküle, sofern deren Protonenaffinität höher als die von Wasser ist und bilden so Analytkationen. Die Bildung von Anionen geht von den bei der Primärionisation freiwerdenden Elektronen aus (Glg. 16 bis Glg. 19), welche im Fall von Luft als Driftgas mit den Sauerstoffmolekülen reagieren ($M = \text{O}_2$). Da die Energie der Ladungsträger, welche mit den Analyten interagieren, durch die vorangegangene Kettenreaktion deutlich geringer ist als die der initialen Strahlung, bleibt bei den meisten Analyten die Molekülstruktur erhalten. Gleichzeitig sorgt die ständige Nachlieferung an Reaktantionen (durch die permanent ablaufende Reaktionskaskade) für eine hohe Wahrscheinlichkeit der Ladungsübertragung und damit einen hohen Umsatz dieses Ionisationsprozesses.



Eine Initialionisation durch radioaktive Quellen bietet einige Vorteile für den Gebrauch in mobilen Geräten, wie Langlebigkeit, Wartungsfreiheit und keinen Bedarf für eine externe Energiequelle. Allerdings erfordern sie aus Sicherheitsgründen besondere technische Ausstattungen sowie Handhabungsvorschriften und sind mit regulatorischen Einschränkungen versehen. Aus diesem Grund gibt es heute zahlreiche Alternativen, sowohl für die Initialionisation beim APCI Prozess als auch generell andere Ionenquellen für die IMS. Zu ersteren zählen Photoionisation über Entladungslampen oder Laser, ebenso wie die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Röntgenquelle. Diese verursacht eine Reaktionskaskade analog zu ^{63}Ni .

Die Auswahl an alternativen Ionisationsmethoden beinhaltet Prozesse wie z.B. die Resonanz-verstärkte Multiphotonenionisation (resonance enhanced multi photon ionization, REMPI),⁵⁷ Coronaentladungen^{58,59} oder Plasmaionisation. Für die Ionisierung flüssiger Proben hat sich die Elektrospray-Ionisation (ESI)⁶⁰⁻⁶² etabliert und für Festkörperoberflächen bzw. Adsorbate sind Laserablation, Matrix-unterstützte Laserdesorption (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)⁶³⁻⁶⁵ und Desorptions-Elektrospray-Ionisation (DESI) geeignet.

Feldabhängige IMS und Kopplungen

Das zuvor behandelte klassische Driftröhren-IMS wird im sogenannten Niedrig-Feld-Bereich betrieben, in welchem die Mobilität unabhängig von der angelegten Feldstärke ist. Allerdings ist insbesondere bei komplexen Stoffgemischen die Trennung einzelner Analyten schwierig, wenn nur eine Konstante dieser Trennung zu Grunde liegt. Zwar ist es beispielsweise möglich, eine Vortrennung per Gaschromatographie (GC) zu verwenden, doch das führt zu einer deutlichen Verlängerung der Analysenzeit. Variationen des Driftgases oder Komplexbildung der Analyten durch sogenannte Dopants verändern die jeweiligen Mobilitäten.⁶⁶ Andere Methoden arbeiten außerhalb des Niedrig-Feld-Bereiches und bedienen sich der dort auftretenden Abhängigkeit der Mobilität von der Feldstärke. Dazu gehören die Feld-asymmetrische IMS (FAIMS), die Aspirator-IMS (aIMS), die differentiellen Mobilitätsanalysatoren (DMA) und die Traveling-Wave-IMS.

Einige grundlegende Probleme der IMS sind die Trennung von Analyten mit ähnlichem Stoßquerschnitt sowie die bei verschiedenen Ionisierungsmethoden während der Ladungsübertragung auftretenden Konkurrenzreaktionen. Diese Effekte führen zur Unterdrückung der Signale einzelner Spezies. So kann beispielsweise bei der APCI eine Substanz mit hoher Protonenaffinität vorrangig mit den Reaktantionen interagieren und damit die Bildung von protonierten Kationen eines anderen Stoffes unterdrücken. Eine Möglichkeit, dem vorzubeugen ist der Einsatz eines dem IM-Spektrometer vorangeschalteten Gaschromatographen. Bei einer solchen Kopplung werden die Analytmoleküle nach der Trennung durch die chromatographische Säule direkt oder über eine Transferkapillare in die Ionisationsregion des IM-Spektrometers überführt. Gegebenenfalls erfolgt dies orthogonal zum

Driftgasstrom und dem angelegten elektrischen Feld um das Risiko der Verunreinigung der Driftregion zu verringern. Die oben erwähnte längere Analysenzeit kann teilweise durch die Verwendung von Multikapillarsäulen oder sogenannten fast-capillary-Gaschromatographen kompensiert werden. Kopplungen von IMS-Geräten mit Massenspektrometern ermöglichen die parallele Untersuchung von Stoßquerschnitt und Masse der Ionen.⁶⁷

Schimmelpilzuntersuchungen mittels IMS

Bereits vor dieser Arbeit gab es IMS-Untersuchungen zu Schimmelpilzen. Diese wurden z.B. mit konventionellen ⁶³Ni- oder Corona-Entladungs-Quellen durchgeführt und betrafen vornehmlich die Substanzklassen der Ketone und Alkohole unter den leichtflüchtigen Schimmelpilzmetaboliten.^{68,69} Weiterhin wurden Untersuchungen von Schimmelpilzmetaboliten in Bausubstanz mittels Aspirator-IMS durchgeführt, wobei die grundlegende Differenzierung von unbelasteter Raumluft im Vordergrund stand.⁷⁰ Eine andere Arbeit beschäftigte sich mit dem Nachweis von Schimmel in Holz durch parallele IMS- und GC-MS-Messungen. Hierbei wurde der zeitliche Verlauf der Freisetzung verschiedener Substanzen während des Pilzwachstums verfolgt.⁷¹ Es gab Untersuchungen zur wechselseitigen Beeinflussung von mVOC hinsichtlich ihrer IM-Spektren und die Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse auf die Messungen von Innenraumluft.⁷² Eine Reihe weiterer Arbeiten beinhalteten die Überwachung von Lebensmittelproduktionsprozessen sowie elektrischen Anlagen, industriellen Wasserkreisläufen oder Atemgasen.^{73,28} Messungen zu Mycotoxinen wurden z.B. an Methanolextrakten von Pistazien durchgeführt, in denen Aflatoxin nachgewiesen wurde.⁷⁴ Andere Untersuchungen betrafen Ocratoxin A in Lakritz oder Zeraleone in Mehl.^{75,76}

2.2.3. Gaschromatographie⁷⁷

Die Analyse komplexer Stoffgemische wie biologische Proben erfordert mitunter einen vorangehenden Trennungsschritt, um Signalunterdrückungen oder Konkurrenzeffekte zu vermeiden. Eine etablierte Methode hierfür stellt die Gaschromatographie dar. Im folgenden Abschnitt sollen die Grundlagen dieser Technik angerissen werden. Zudem wird eine kurze Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Probenbehandlung erfolgen.

Prinzip

Die Gaschromatographie (GC) umfasst per definitionem alle Methoden, bei denen ein Stoffgemisch zwischen zwei Phasen getrennt wird, von denen eine gasförmig ist. Voraussetzung ist, dass beide Phasen nicht mischbar sind. Das Gas dient als Transportmedium für das Stoffgemisch, und wird mobile Phase genannt. Grundlage der Trennung sind unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte der Komponenten des Stoffgemisches zwischen den Phasen. Die sogenannte stationäre Phase, welche den Stofftransport temporär unterbindet, kann ein Feststoff oder eine Flüssigkeit auf einem festen Trägermaterial sein. Im ersten Fall bestimmen Adsorptionseigenschaften die Verteilung zwischen den Phasen, im zweiten Fall sind dafür die jeweiligen Löslichkeiten verantwortlich.

Zwischen dem Analyten und der stationären Phase kann eine Reihe von Wechselwirkungen auftreten, die sich in vier Kategorien unterteilen lassen. Orientierungskräfte treten zwischen permanenten Dipolen auf. Dazu zählen z.B. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einer Hydroxidgruppe des

Analyten (z.B. Alkohol) und einer elektronenreichen funktionellen Gruppe der Phase (z.B. Polyethylenglycol in SUPELCOWAX® 10). Induktionskräfte entstehen zwischen Dipolen und induzierten Dipolen, während Dispersionskräfte von fluktuierenden Dipolen ausgehen. Letzteres tritt bei allen Molekülen auf, da die Elektronendichteverteilung innerhalb dieser variiert und erst im zeitlichen Mittel die beobachtbare Eigenschaft Polarität aufweist. Zuletzt gibt es noch spezifische Kräfte wie Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen, bei denen eine vorübergehende Bindung, z.B. zwischen einem π -System und einer stark elektrophilen Gruppe, aufgebaut wird.

Die Darstellung einer GC-Trennung wird als Chromatogramm bezeichnet. Dabei wird die Zahl der am Detektor ankommenden Teilchen (als Intensität) über der Retentionszeit t_R aufgetragen. Diese unterteilt man in verschiedene Abschnitte. Die Mobilzeit t_M ist der Zeitraum, in dem das Trägergas die Trennstrecke zurücklegt. Die reduzierte Retentionszeit t'_R liegt zwischen der Ankunft von Gas und Analyt vor. Die Totzeit t_d bzw. das Totvolumen V_d würde vom jeweils betrachteten Teilchen zurückgelegt, wenn zwischen Injektor und Detektor keine Trennsäule vorhanden wäre.

Die Trennleistung einer Säule wird durch die Auflösung $R_{1,2}$ beschrieben, welche die Unterscheidung zweier benachbarter Peaks beschreibt (Glg. 20). Der Faktor 1.177 ergibt sich aus der Bestimmung der Halbwertsbreite $b_{H(i)}$ unter der Annahme einer symmetrischen Peakform.

$$R_{1,2} = 1.177 * \frac{t_{R1} - t_{R2}}{b_{H(1)} + b_{H(2)}} \quad (20)$$

Demnach bedeutet eine Auflösung von $R_{1,2} = 1$, dass die beiden betrachteten Peaks zu 98 % ihrer jeweiligen Flächen getrennt sind, sofern sie die gleiche Intensität besitzen. In der praktischen Durchführung kann die Trennung von Stoffen durch die Wahl der stationären Phase (Material, Schichtdicke, Säulenlänge), die Fließgeschwindigkeit und Art der mobilen Phase und die angelegte Temperatur (isotherm oder Temperaturprogramm) beeinflusst werden. Das Material der stationären Phase wird dabei meist entsprechend seiner Polarität in Abhängigkeit der zu untersuchenden Substanzen ausgewählt. Das in dieser Arbeit verwendete unpolare SPB®-5 ist nur eine von über 90 Phasen, welche bei Firmen wie z.B. Sigma-Aldrich kommerziell erhältlich sind.⁷⁸

Retentionsindex

Bei der Durchführung paralleler Messungen an verschiedenen Gaschromatographen muss die Korrelation ihrer Ergebnisse anhand einer eindeutig definierten Größe erfolgen, um den Einfluss statistischer Schwankungen zu minimieren. Eine bewährte Methode hierfür ist die Verwendung des sogenannten Retentionsindex I_x , sofern die zu vergleichenden Messungen bei gleicher stationärer Phase und ähnlicher Temperatur (± 10 K) durchgeführt werden. Dieser Index wird unter Zuhilfenahme eines externen (oder wenn möglich internen) Standards berechnet (Glg. 21). Dabei handelt es sich in der Regel um Vertreter der homologen Reihe der n-Alkane, deren Retentionszeiten als Ankerpunkte für die Berechnung dienen. Man verwendet die beiden Alkane, die direkt vor und nach dem betrachteten Analyten detektiert werden. Die Zahl der Kohlenstoffatome in diesen Alkanen (z und $z+m$) fließt in die Berechnung ein.

$$I_x = 100m \left(\frac{\lg t'_{rx} - \lg t'_{rz}}{\lg t'_{r(z+m)} - \lg t'_{rz}} \right) + 100z \quad (21)$$

Die Reproduzierbarkeit des Retentionsindex liegt im Idealfall bei $I_x \pm 0.05$ für Wiederholungsmessungen am selben Gerät und $I_x \pm 1$ für Messungen an verschiedenen Geräten.

Probentransfer

Die Überführung von Analyten auf die Trennsäule kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, wie z.B. durch das Verdampfen von Lösungen im Injektor des Gaschromatographen. Für leicht flüchtige Substanzen ist die sogenannte Headspace (HS)-Probennahme mittels Festphasenmikroextraktion (solid phase micro extraction, SPME) gut geeignet.

Wird ein Feststoff oder eine Flüssigkeit, welche flüchtige Substanzen beinhaltet, in einem geschlossenen Gefäß gelagert, bildet sich ein Verteilungsgleichgewicht dieser Stoffe zwischen den Phasen aus. Das an diesem Gleichgewicht beteiligte Gasvolumen wird als Headspace bezeichnet. Die Entnahme dieses Gasvolumens erlaubt somit die Extraktion und Überführung der Analyten unter Vermeidung von Störsubstanzen. Dabei gibt es zwei Vorgehensweisen. Zum einen wird gewartet bis sich das Gleichgewicht eingestellt hat, woraufhin ein Teil des Volumens überführt wird. Dieses als statische Headspace-Analyse (HSA) bezeichnete Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der SPME angewendet. Die dynamische HSA dagegen überführt den Gasvolumen kontinuierlich. Das heißt, ein Gasstrom wird über oder wenn möglich durch die Probe geleitet. Die permanente Abfuhr des Gasvolumens führt zur Verschiebung des Verteilungsgleichgewichtes auf die Seite der im Headspace befindlichen Analyten. Die Konzentration der Substanzen in der Probe nimmt dabei exponentiell mit der Zeit ab. Mit diesem als purge-and-trap bezeichneten Verfahren werden die Substanzen aufkonzentriert und schließlich in den Gaschromatograph injiziert. Bei genügend langer Extraktionszeit oder sehr häufigem Wiederholen des purge-and-trap-Vorgangs kann damit eine nahezu vollständige Überführung der Analyten erreicht werden.⁷⁹

Die Festphasenmikroextraktion erfolgt durch die Verwendung einer mit Adsorptionsmaterial belegten Faser, welche sich in einer Kanüle befindet. Die Kanüle wird benutzt, um das im Deckel des HS-Gefäßes befindliche Septum zu durchstechen. Die Faser wird in den Gasvolumen eingebracht, woraufhin sich ein zusätzliches Verteilungsgleichgewicht zwischen Gas und Faseroberfläche einstellt. Somit liegt hier ein Drei-Phasen-System vor, in dem die Menge der auf der Faser adsorbierten Substanz von den verschiedenen Verteilungskoeffizienten (und damit u.a. von der Polarität der Beladung) sowie der Natur des Analyten und der Temperatur abhängt.

2.2.4. Massenspektrometrie²⁴

Prinzip

Eine der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) verwandte Methode ist die Massenspektrometrie (MS). Auch bei dieser werden ionisierte Analyten in einem elektrischen Feld bewegt, wobei diese Bewegung von einer bestimmten Substanzeigenschaft abhängt, in diesem Fall von der Masse. Im Gegensatz zur IMS gibt es hier kein neutrales Gas, mit dem die Ionen wechselwirken könnten. Stattdessen findet die Trennung im Vakuum statt, um sicherzustellen, dass nur die Masse als stoffspezifische Größe einen Einfluss auf die Bewegung der Ionen hat. Für die resultierende Bewegung ist das Verhältnis von Masse m und Ladungszahl z der Ionen ausschlaggebend. Diese Ladung ist neben der Teilchenart auch

von der verwendeten Ionisationsmethode abhängig. Ihr Einfluss auf die Bewegung liegt in der Coulomb-Kraft, die durch das elektrische Feld auf die Ionen wirkt. Da bewegte Ladungen ein magnetisches Moment besitzen, kann die Flugbahn der Ionen auch durch angelegte Magnetfelder beeinflusst werden. Die verwendeten elektrischen und magnetischen Felder können, je nach MS-Methode, statisch oder dynamisch sein. Sie bewirken entweder eine Auslenkung der Flugbahn der Ionen oder eine Änderung der Fluggeschwindigkeit in Abhängigkeit des Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z).

Massenspektrum

Im Gegensatz zur IMS werden bei der Massenspektrometrie nicht nur sanfte Ionisationsmethoden verwendet. Häufig werden ionische und neutrale Bruchstücke aus den Analytmolekülen generiert, deren Massen von den im Molekül vorhandenen Bindungen und der verwendeten Ionisationsmethode abhängen. Damit entstehen charakteristische Fragmentmuster, die zur Identifizierung der jeweiligen Substanz benutzt werden.

Ein Massenspektrum stellt die Zahl der detektierten Ladungen über dem m/z -Verhältnis graphisch dar. Dabei wird die Ladungszahl als Intensität I wiedergegeben. Das Masse-Ladungs-Verhältnis ist per definitionem eine dimensionslose Größe.²⁴ In manchen Literaturstellen wird aber auch die Einheit Thomson (Th) verwendet. Die Fragmentmuster einer Substanz beinhalten solche Massenpeaks, die zu geladenen Bruchstücken gehören. Die Massen ungeladener Fragmente entsprechen den Differenzen zwischen den Peaks, welche aber nicht zwingend benachbart sein müssen. Sie werden als atomare Masseneinheiten (unified atomic mass, u) oder in der Einheit Dalton (Da) angegeben.²⁴ Sofern keine Cluster- oder Oligomerbildung stattfindet, stellt der Molekülionenpeak das Signal mit der größten Masse dar. Dieser ist jedoch nicht immer zu sehen, da die Fragmentierung häufig vollständig abläuft. Der Peak mit der größten Intensität repräsentiert das stabilste Fragment und wird als Basispeak bezeichnet. Üblicherweise werden die Intensitäten eines Spektrums auf diesen Peak normiert und dann als relative Intensitäten angegeben. Auch die Normierung auf die Summe aller Intensitäten oder der Intensitäten in einem definierten Massenbereich ist möglich.

Linear-Quadrupol-Ionenfalle

Massenspektrometer arbeiten nach verschiedenen Prinzipien, welche sich in der Beeinflussung der Ionenbewegung unterscheiden. Beispiele hierfür sind Flugzeit- (Time-of-Flight, ToF) und Sektorfeld-MS-Geräte, Fouriertransform-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometer oder Linear-Quadrupol Ionenfallen (linear trap quadrupole, LTQ).

Das Prinzip des LTQ soll nun kurz beschrieben werden. Grundlegend besteht die Falle aus vier Stab- bzw. Zylinderelektroden, die im Querschnitt quadratisch angeordnet sind. An den sich gegenüber liegenden Elektroden wird immer das gleiche Potential angelegt, wobei dieses periodisch umgeschaltet wird. Dies führt bei Ionen, welche die Falle parallel zur Elektrodenausrichtung durchfliegen zu orthogonalen Schwingungen bzw. Rotationen, deren Amplitude von der Feldstärke und dem m/z -Verhältnis der Ionen abhängt. An den Enden der durch die Elektroden aufgespannten Strecke ist das angelegte Potential so eingestellt, dass die Ionen in die Falle zurückreflektiert werden. Auf diese Weise werden die Analyten über einen definierten Zeitraum gesammelt. In zwei der vier

Elektroden befinden sich Spaltöffnungen, durch welche die Ionen die Falle verlassen und zum Detektor gelangen können, sofern ihr Masse-Ladung-Verhältnis bei der jeweils eingestellten Feldstärke eine genügend große Amplitude erlaubt. Auf diese Weise wird durch das kontinuierliche Ändern der Feldstärke ein Massenbereich abgescannt. Die Verweilzeiten der Ionen in der Falle liegen üblicherweise zwischen einigen Millisekunden und wenigen Sekunden.

Elektronenstoßionisation

Für die Erzeugung der bei der MS notwendigen Ionen gibt es eine Vielzahl von Methoden wie z.B. chemische Ionisation (chemical ionization, CI, ähnlich der APCI), Feldionisierung (field-ionization, FI), Fast Atom Bombardement (FAB), Matrix-unterstützte Laserdesorption (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI) und Elektrospray-ionisation (ESI).

Eine weitere etablierte Methode ist die Elektronenstoßionisation (electron impact, EI). Dieser Prozess beruht auf der Kollision von beschleunigten Elektronen mit den neutralen Analytmolekülen. Dabei wird ein Teil der kinetischen Energie des Elektrons auf das Molekül übertragen. Ist diese Energie groß genug, kommt es zur induzierten Freisetzung eines weiteren Elektrons aus dem Molekül und damit zur Bildung eines Radikalkations. Wird die Ionisierungsenergie nicht überschritten, wird ein energetisch angeregter Zustand besetzt. Dieses Teilchen kann dann mit einem anderen Molekül im Grundzustand kollidieren, bei diesem eine Elektronenfreisetzung induzieren und so ein Radikalkation bilden. Dieser Prozess, der als Penning-Ionisation bezeichnet wird, setzt voraus, dass die Ionisierungsenergie des zweiten Moleküls energetisch kleiner ist als der angeregte Zustand des ersten. Alternativ können beide Teilchen unter Elektronenabgabe ein Clusterion bilden. Dies wird assoziative oder Hornbeck-Ionisation genannt. Andere mögliche Prozesse sind die dissoziative Ionisation, bei der ein Radikal und ein Kation gebildet werden, sowie die Elektronenanlagerung, welche zu Radikalanionen führt. Die Anlagerung eines Elektrons erfolgt nur, wenn es eine geringe Energie besitzt, also im Bereich von thermischer Energie bis zu wenigen Elektronenvolt, und/oder wenn das Neutralteilchen sich durch eine hohe Elektronenaffinität auszeichnet. Weiterhin sind Prozesse wie die dissoziative Elektronenanlagerung unter Entstehung von Radikal und Anion bekannt, sowie die Ionenpaarbildung, bei der ein Anion und ein Kation aus einem Neutralteilchen entstehen.

Da die Wahrscheinlichkeit für den Ablauf der beschriebenen Prozesse von der Energie der Elektronen abhängt und man möglichst viele der Analyten ionisieren möchte, verwendet man in der Regel Anfangsenergien von ca. 70 eV. In diesem Bereich ist der Ionisationsquerschnitt⁸⁰ für die meisten Moleküle maximal. Dabei ist zu beachten, dass hierbei Valenzelektronen entfernt werden. Zur Abspaltung von inneren Elektronen wie z.B. der K-Schale eines Atoms werden Energien im Bereich von keV benötigt.⁸¹ Abhängig von der initial übertragenen Energie folgen auf die Ionisation ein oder mehrere Fragmentierungsschritte, bei denen Bindungen im Molekül entsprechend ihrer Stärke gespalten werden. Dabei können sowohl Neutralteilchen als auch Radikale entfernt werden und es entstehen charakteristische Fragmentmuster auf Grundlage der Molekülstruktur.

Zeitlich lassen sich die genannten Abläufe folgendermaßen einordnen: Die Ionisation liegt im Bereich von Femtosekunden, Bindungsbrüche benötigen Pico- bis Nanosekunden, Umlagerungen finden in etwas weniger als einer Mikrosekunde statt und bei Zeiten größer als eine Mikrosekunde können metastabile Dissoziationen erfolgen.

In der Regel wird die Elektronenstoßionisation bei Drücken von $p = 10^{-5}$ bis 10^{-4} Pa durchgeführt. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit für Stöße zwischen den Analytmolekülen verringert und somit

werden Reaktionen zwischen diesen vermieden. Die Bildung der Initialelektronen erfolgt über ein Heizfilament, welches Elektronen freisetzt die anschließend mit einer Beschleunigungsspannung von 70 Volt auf die Analytmoleküle geschossen werden. Bei einer kleineren Spannung verringert sich die Ionisierungseffizienz und damit die Sensitivität der Messung, aber auch die Fragmentierungswahrscheinlichkeit. Dies kann sinnvoll sein, wenn man vor allem an dem Molekülionenpeak und dem Basispeak interessiert ist. Allerdings können vermehrt Memory-Effekte auftreten.

Kollisionsinduzierte Dissoziation

Einige der genannten Ionisationsmethoden führen nicht zu Fragmentmustern, sondern zeigen lediglich den Molekülionenpeak. Dies kann besonders für Kopplungen mit anderen Techniken sinnvoll sein, wenn man z.B. ein Mapping einer Substanzmischung erstellen möchte.

Sollen trotzdem zusätzliche Strukturinformationen erhalten werden, kann man beispielsweise die sogenannte kollisionsinduzierte Dissoziation (collision induced dissociation, CID) einsetzen. Dabei werden in einem begrenzten Bereich des Spektrometers kurzzeitig neutrale Gasmoleküle zur Verfügung gestellt, mit denen die Ionen kollidieren können. Der Gasdruck, welcher in der Größenordnung von 10^{-4} Pa liegt, bestimmt die Häufigkeit der Kollisionen und damit auch die Zahl der Fragmentierungsschritte. Ist er zu hoch, kommt es zur Streuung der Ionen sowie zu Ladungsübertragungen bzw. Entladungsprozessen, was einen Informationsverlust bedeutet.

Die Art des verwendeten Gases richtet sich nach dem jeweiligen Massenspektrometer. Für Sektorfeld- und Flugzeit-Geräte wird üblicherweise Helium verwendet, um Ladungsübertragungen zu vermeiden (hohe Ionisierungsenergie von He). Bei Quadrupol-Spektrometern und Ionenfallen sind Stickstoff, Argon oder Xenon besser geeignet, da die Effizienz der Energieübertragung beim CID von den Massen der beteiligten Stoßpartner abhängt und Ladungsübertragungen durch die Ansammlung der Analyten eine geringere Rolle spielen.

2.2.5. Multivariate Datenanalyse⁸²

In Kapitel 2.2.2 wurde gezeigt, wie ein Peak im IM-Spektrum einem Analyten zugeordnet werden kann. Die Intensität des Signals ist proportional zur Menge der am Detektor ankommenden Ladungsträger (Ionen). Dementsprechend kann man aus der Peakintensität Rückschlüsse auf die Konzentration des Analyten ziehen, sofern die Proportionalität bekannt ist. Diese lässt sich beispielsweise durch eine Kalibration anhand einer Konzentrationsreihe ermitteln. Ein solches Vorgehen wird als univariate Analyse⁸³ bezeichnet, da hierbei einem Objekt (Substanz mit Konzentration x) genau ein Merkmal (Peak mit Intensität y) zugeordnet wird.

Für Problemstellungen mit mehreren Objekten und betrachteten Merkmalen deren Zuordnung nicht eindeutig (bekannt) ist, funktioniert diese Herangehensweise nicht mehr. In so einem Fall wie etwa den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Korrelationen zwischen verschiedenen Nährstoffgehalten und LIB-Spektren mit einer Vielzahl von Peaks kommt die multivariate Datenanalyse (multivariate analysis, MVA) zum Einsatz.

Prinzip und Einteilung

Neben dem Begriff multivariate Analyse findet man in der Literatur auch die Bezeichnungen Machine Learning oder Statistical Learning. Allgemein beschreibt dies die Gesamtheit aller Methoden, die versuchen in einem System einen einfachen Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variablen herzustellen. Dabei ist die tatsächliche Abhängigkeit unbekannt oder zu komplex, um sie in praktischen Anwendungen nutzen zu können. Die unabhängige Variable oder das Objekt x wird auch als predictor oder feature bezeichnet. Die abhängige Variable bzw. das Merkmal y nennt man auch response oder observation. Einen einfachen Zusammenhang herzustellen heißt, dass für y eine Funktion $f(x)$ erstellt wird, zu der eine um Null schwankende Fehlerabweichung e hinzukommt. Der Zusammenhang lautet also allgemein:

$$y=f(x)+e \quad (22)$$

Wenn die Funktion den Zusammenhang gut genug beschreibt, lassen sich innerhalb der Fehlergrenzen von e Vorhersagen zu y oder Rückschlüsse auf x treffen. Da $f(x)$ selbst eine Näherung darstellt, ist sie ebenfalls fehlerbehaftet. Dieser Fehler kann allerdings im Gegensatz zu e minimiert werden, indem ein geeignetes Modell zur Bestimmung von $f(x)$ verwendet wird. Die Auswahl dieses Modells ist die eigentliche Herausforderung der multivariaten Datenanalyse. Die Daten, anhand derer das Modell erstellt wird, nennt man Trainingsdaten oder Trainingsatz. Wird das Modell zur Überprüfung an anderen Objekten mit bekannten Merkmalen angewendet, werden diese Daten als Testatz bezeichnet.

Ziel der MVA ist es, aus einem vorhandenen Datensatz ein Modell bzw. die Funktion $f(x)$ abzuleiten, womit eine Vorhersage über die Merkmalsausprägung eines neuen Datensatzes getroffen werden kann. Grundsätzlich gibt es zwei Herangehensweisen, um f zu bestimmen: parametrische und nicht-parametrische Methoden. Ersteres heißt, dass eine Annahme zur Beschaffenheit der Funktion gemacht und daraus eine bestimmte Anzahl von Parametern generiert wird, die das Problem beschreiben. Ein zugehöriges Modell berechnet die Parameter und erstellt damit eine Vorhersage für das Merkmal y . Die Güte der Vorhersage hängt von der gemachten Annahme und dem zugehörigen Modell ab. Eine höhere Anzahl an Parametern kann die Vorhersage verbessern, erhöht aber auch das Risiko für das sogenannte overfitting. Dabei werden statistische Schwankungen und Untergrundrauschen mitberechnet, was die Übertragung des Modells zur Vorhersage neuer Daten beeinträchtigt. Nichtparametrische Methoden legen keine Annahme zugrunde, sondern suchen nach einer Funktion, die möglichst gut zu den vorhandenen Daten passt. Dadurch wird vermieden, dass eine eventuell ungeeignete Annahme zu einer verfälschenden Vorhersage führt. Diese Methoden können prinzipiell auf alle möglichen Daten angewendet werden, benötigen aber eine sehr hohe Anzahl an Variablen und neigen stärker zum overfitting.

Unabhängig von der Herangehensweise unterscheiden sich alle in der MVA eingesetzten Modelle in ihrer Flexibilität. Damit ist gemeint, dass sie sich unterschiedlich gut an die vorhandenen Daten anpassen lassen. Flexiblere Modelle stellen den Zusammenhang zwischen x und y realitätsnäher dar, und werden dementsprechend dann eingesetzt, wenn eine hohe Vorhersagegenauigkeit verlangt ist. Sie neigen allerdings stärker zum overfitting und erzeugen eine Funktion, die ähnlich komplex ist wie der tatsächliche Zusammenhang zwischen Objekt und Merkmal, wodurch ihre Interpretierbarkeit

verloren geht. Will man also Rückschlüsse auf betrachtete Objekte ziehen oder konkrete Ursache-Wirkung-Beziehungen beschreiben, so sind striktere Modelle besser geeignet. Hier sind die Vorhersagen weniger exakt aber die Zuordnung von Objekt und Merkmal ist eindeutiger.

Eine weitere Einteilung der in der multivariaten Analyse verwendeten Methoden bzw. Modelle erfolgt anhand der zur Verfügung stehenden Daten. In allen Fällen werden die Modelle anhand der vorhandenen Objekte erstellt. Sind zu diesem Zeitpunkt bereits Merkmale zu beobachten, kann das Modell an diesen überprüft bzw. ausgerichtet werden. Diesen Fall bezeichnet man als supervised learning (überwachtes Lernen). Sind keine Merkmale gegeben, wird ein entsprechendes Modell darauf angelegt sein die Objekte logisch zu ordnen bzw. einzuteilen, z.B. in Form von Clustern. Hierbei spricht man vom unsupervised learning (freies Lernen). Sind die Merkmale in sehr viel kleinerer Zahl vorhanden als die Objekte so ist von semi-supervised learning die Rede. Hier ist eine Ausrichtung des Modells nur in eingeschränktem Maße möglich.

Die Natur der beobachteten Merkmale bestimmt die Problemstellung. Handelt es sich bei ihnen um Zahlen, können sie quantifiziert werden und stellen somit ein Regressionsproblem dar. Sind es hingegen Eigenschaften, so können sie nur qualitativ betrachtet werden und es liegt ein Klassifizierungsproblem vor. Die genaue Natur der verwendeten Objekte ist nicht von Bedeutung solange sie sich in irgendeiner Weise codieren lassen. Die in den folgenden Abschnitten besprochenen Themen beziehen sich ausschließlich auf Regressionsprobleme.

Grundlegende mathematische Werkzeuge

Alle Methoden der multivariaten Analyse basieren auf der Erstellung einer Funktion, welche den Zusammenhang zwischen Objekten und Merkmalen beschreibt. Hierfür werden Korrelationen zwischen Objekt-Merkmal-Paaren bzw. zwischen verschiedenen Objekten gesucht und beschrieben. Einige Methoden, die mehrheitlich in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden, werden weiter unten in diesem Kapitel beschrieben. Zunächst sollen nun einige Werkzeuge der multivariaten Analyse, die zum Verständnis der unten beschriebenen Modelle notwendig sind, vorgestellt werden.

Grundsätzlich werden in der MVA alle Objekte als Vektoren in einem fiktiven Koordinatensystem dargestellt. Dieses System kann aus der Zahl der Objekte und der Merkmale bestehen oder aus der Codierung mehrerer Objekte. Häufig legen Modelle neue virtuelle Vektoren in das System, die sich durch bestimmte Abstände zu den abgebildeten Datenpunkten auszeichnen. Die Generierung dieser Vektoren erfolgt z.B. über die Linearkombination (LK, Glg. 23) der originalen Vektoren. Ein kritischer Arbeitsschritt ist dabei die Wahl der entsprechenden Koeffizienten v_i , da diese den mittleren Abstand der entstehenden Fitfunktion von den Datenpunkten bestimmen und somit einen signifikanten Einfluss auf die Vorhersagegenauigkeit haben.

$$\text{LK} = \begin{pmatrix} x_{\text{LK}} \\ y_{\text{LK}} \\ z_{\text{LK}} \end{pmatrix} = v_1 \cdot \begin{pmatrix} x_1 \\ y_1 \\ z_1 \end{pmatrix} + v_2 \cdot \begin{pmatrix} x_2 \\ y_2 \\ z_2 \end{pmatrix} + \dots + v_n \cdot \begin{pmatrix} x_n \\ y_n \\ z_n \end{pmatrix} \quad (23)$$

Der genannte Abstand zwischen Fit und Datenpunkten wird meist durch die Summe der Abweichungsquadrate (residual sum of squares, RSS) dargestellt. Es handelt sich also um die Differenz zwischen einem Merkmal y und dessen Vorhersage anhand des zugehörigen Objektes x . In Gleichung 24 ist dies für den Fall einer linearen Regression gezeigt. Werden die Koeffizienten m und n der Regression so gewählt, dass die RSS minimal wird, so beschreibt der erhaltene Fit den größten Teil

der Abhängigkeit zwischen Merkmalen und Objekten. Diese Vorgehensweise wird als das least squares Kriterium (kleinste Fehlerquadrate) bezeichnet.

$$RSS=(y_1-n\cdot m\cdot x_1)^2+(y_2-n\cdot m\cdot x_2)^2+\dots+(y_n-n\cdot m\cdot x_n)^2 \quad (24)$$

Der in Gleichung 24 erhobene Zusammenhang wird auch mittlerer quadratischer Fehler (mean square error, MSE) genannt. Angewendet auf den Trainingsdatensatz zeigt der MSE wie gut das Modell sich an die Objekte anpasst, d.h. ob es überhaupt für das vorliegende Problem geeignet ist.

Da diese Anpassung durch flexiblere Modelle besser wird, und damit der Trainings-MSE verringert wird, gleichzeitig aber auch die Tendenz zum overfitting steigt, muss das Modell für eine realistische Bewertung an einem Testsatz überprüft werden. Das overfitting der Trainingsdaten führt dazu, dass das erhaltene Modell stärker von den Testdaten abweicht. Somit steigt der zu diesen Daten gehörende MSE an. Die Modellflexibilität und das overfitting wirken sich also gegenläufig auf den MSE der Testdaten aus. Somit existiert in einer Auswahl verschiedener Modelle für eine gegebene Problemstellung stets ein Modell welches als optimal betrachtet werden kann. Dieses besitzt den geringsten MSE für die Testdaten.

Um den Test-MSE für einen vorhandenen Trainingsdatensatz zu bestimmen kann die sogenannte Kreuzvalidierung (cross validation, cv) verwendet werden. Dies geschieht grundsätzlich dadurch, dass ein Teil der Trainingsdaten nicht zur Modellierung verwendet wird und später für die Überprüfung zur Verfügung steht. Entscheidend ist dabei, dass die Auswahl der zurückgehaltenen Daten zufällig erfolgt, um eine Verfälschung vorhandener Zusammenhänge zu vermeiden. Je nach Auswahl der Daten gibt es verschiedene Formen der Kreuzvalidierung. Beim Validierungssatz-Verfahren werden 50 % der Daten zurückgehalten. Das stellt die einfachste Methode mit relativ geringem Rechenaufwand dar. Allerdings hat man hier eine starke Reduzierung der Zahl der Datenpunkte, was bei allen statistischen Methoden zu einer Verringerung der Zuverlässigkeit führt. Bei der leave-one-out-Methode wird an einem Datensatz mit n Punkten die Modellierung genau n-mal durchgeführt mit n-1 Trainingsdaten. Das heißt, es wird immer ein Punkt als Test zurückgehalten und die Zahl der durchgeführten Validierungen entspricht der Zahl der Punkte. Das hat den Vorteil, dass die erhaltenen Modelle die Datenpunkte nahezu exakt beschreiben und die Mittelung aller Anpassungen sehr nahe an der Realität des Zusammenhangs von Objekten und Merkmalen liegt. Andererseits ist hier der Rechenaufwand maximal und es kann keine sichere Aussage zum overfitting gemacht werden. Einen Mittelweg zwischen den bisher beschriebenen Methoden stellt die k-fache Kreuzvalidierung (k-fold cv) dar. Dabei wird der Datensatz nicht in zwei sondern in k gleiche Teile zufällig aufgeteilt und jeder Teil wird einmal als Testsatz verwendet.

Bei der MVA treten allgemein zwei Effekte auf. Zum einen wird bei der Verwendung unterschiedlicher Trainingssätze immer eine etwas andere Vorhersage entstehen. Dieser Umstand wird als Varianz bezeichnet. Zum anderen sorgt die Vereinfachung $f(x)$ des Zusammenhangs zwischen Objekten und Merkmalen für einen systematischen Fehler, den sogenannten bias. Beide Effekte sind gegenläufig abhängig von der Flexibilität eines Modells sowie von der Anzahl der verwendeten Datenpunkte und ergeben gemeinsam mit dem unvermeidbaren Fehler e den MSE einer Vorhersage. Für die Kreuzvalidierung bedeutet das, mit steigendem k sinkt der bias und steigt die Varianz. Welcher der beiden Effekte den größeren Einfluss hat, hängt von der Problemstellung ab. In der Regel arbeitet man mit den k-Werten 5 oder 10.⁸⁴⁻⁸⁷

Methoden

Im Folgenden sollen die fünf in dieser Arbeit verwendeten Modellierungsmethoden vorgestellt werden. Die als LASSO und ridge regression bekannten Modelle gehören zu den sogenannten shrinking-Methoden, welche die Zahl der Objekte verringern indem sie diejenigen mit geringem Informationsgehalt eliminieren. Die Hauptkomponentenanalyse und die partial least square regression stellen dagegen Dimensionsreduzierungen dar, welche neue Objekte erzeugen, die den im System vorhandenen Informationsgehalt zusammenfassen. Die Gaußschen Prozesse gehören, im Gegensatz zu den anderen vier Modellen, zu den nicht-parametrischen Methoden und erzeugen einen Wahrscheinlichkeitsraum für die Vorhersage der gesuchten Eigenschaften eines Systems.

Die ridge regression beruht auf den oben beschriebenen Fehlerquadraten. Sie stellt eine Erweiterung dieser dar, bei der zu dem vorhandenen quadratischen Term ein weiterer addiert wird. Dieser enthält die Objekt-verknüpften Regressionskoeffizienten (β_j) und wird zudem mit einem zusätzlichen Faktor λ multipliziert (Glg. 25). Der Term wird als shrinkage penalty bezeichnet und sorgt dafür, dass die Regressionskoeffizienten gegen Null gehen müssen, wenn die gesamte Regression minimal werden soll. Das ist notwendig, um das Modell möglichst gut an die Datenpunkte anzupassen und hat zur Folge, dass die Gewichtung einzelner Koeffizienten reduziert wird, was einer Verringerung der Modellierungsparameter entspricht. Wie groß der Einfluss des penalty-Terms ist, hängt von dem enthaltenen Faktor λ ab. Dieser wird als Tuning-Parameter bezeichnet.

$$\sum_{i=1}^n \left(y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^p \beta_j x_{ij} \right)^2 + \lambda \sum_{j=1}^p \beta_j^2 = \text{RSS} + \lambda \sum_{j=1}^p \beta_j^2 \quad (25)$$

Im Gegensatz zu den least squares werden hier mehrere Sätze von Regressionskoeffizienten generiert, welche jeweils abhängig von λ sind. Der Tuning-Parameter muss deshalb optimiert werden um die besten Koeffizienten zu finden, was beispielsweise mit Hilfe der Kreuzvalidierung erfolgen kann.

Eine zur ridge regression ähnliche Methode ist der least absolute shrinkage and selection operator (LASSO). Hier beinhaltet der penalty-Term nicht das Quadrat der jeweiligen Koeffizienten, sondern den Betrag. Dadurch streben sie beim Minimieren nicht gegen Null, sondern werden gleich Null gesetzt. Somit werden nicht nur die Modellierungsparameter reduziert. Die entscheidenden Zusammenhänge zwischen den Objekten und den Merkmalen bleiben übrig, was die Interpretierbarkeit der entstehenden Vorhersage erhöht.

Bei der Hauptkomponentenanalyse (principle component analysis, PCA) werden nacheinander Linearkombinationen der Variablen x_i und y_i erzeugt. Dabei wird die erste Hauptkomponente so gewählt, dass das least squares-Kriterium erfüllt ist. Dadurch verläuft der Vektor dieser Komponente entlang der größten Streuung der Datenpunkte und beschreibt damit auch den größten Teil der Abhängigkeit zwischen Merkmalen und Objekten. Die zweite Hauptkomponente wird so generiert, dass ihr Vektor senkrecht zu dem der ersten liegt. Das heißt, sie verläuft entlang der größten Datenstreuung für alle Variablen die nicht durch die erste Komponente erfasst werden. Das wird

dadurch erreicht, dass die Daten auf die erste Komponente abgebildet werden. Es wird also ein neues Koordinatensystem mit dieser Komponente als Achse erstellt.

Prinzipiell können genauso viele Komponenten erstellt werden, wie Objekte vorhanden sind. Allerdings sinkt mit ihrer Zahl der individuelle Informationsgehalt und die Varianz nimmt zu. Daher wird in der Hauptkomponentenanalyse davon ausgegangen, dass man nur die ersten Komponenten benötigt, um die Merkmale des betrachteten Systems ausreichend gut vorherzusagen. Die Hauptkomponenten beinhalten den größten Informationsgehalt des betrachteten Systems. Gleichzeitig wird durch die Verringerung der Variablenzahl die Wahrscheinlichkeit für ein overfitting gesenkt. Dies führt dazu, dass beim Modellieren mit dieser Methode oft eine bessere Vorhersage entsteht als bei der Verwendung der ursprünglichen Objekte. Man muss jedoch berücksichtigen, dass es sich bei der PCA nicht um eine Auswahlmethode handelt. Das bedeutet, alle ursprünglichen Objekte fließen in die Generierung der neuen Variablen ein, was die Interpretierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse erschwert.

Die partial least square regression (PLSR) funktioniert ähnlich wie die PCA. Im Unterschied zu dieser wird hier allerdings bei der Komponentengenerierung nicht das least squares-Kriterium verwendet. Stattdessen werden für die erste Komponente alle Koeffizienten der Linearkombination durch einen Wert ersetzt, welcher dem Koeffizient einer linearen Regression zwischen Merkmalen und Objekten entspricht. Anschließend werden die ursprünglichen Objekte auf diese Komponente abgebildet. Die Differenzen zwischen den Objekten und der ersten Komponente bilden die Variablen für die lineare Regression bei der Erstellung der zweiten Komponente. Dieser Vorgang wird wiederholt bis man eine bestimmte Anzahl an Komponenten erhalten hat. Diese Komponenten stellen die neuen Objekte für die weitere Modellierung dar. Diese wiederum erfolgt durch eine lineare Anpassung an die Merkmale unter Einhaltung des least squares Kriteriums.

Für jede Zahl an Komponenten wird das dazugehörige Modell mittels Kreuzvalidierung überprüft, bis die optimale Anzahl an Wiederholungsschritten gefunden ist. Eine Auftragung des MSE über der Zahl der Komponenten sollte ein Minimum aufweisen, welches der für die Modellierung optimalen Komponentenzahl entspricht.⁸³ Anstelle des MSE kann man auch die durch die Komponenten beschriebene prozentuale Varianz auftragen, welche in einem ansteigenden Verlauf bei der optimalen Komponentenzahl den Beginn eines Plateaus aufweisen sollte.⁸³

Anders als die PCA handelt es sich bei der PLSR um eine Methode des überwachten Lernens. Durch die Verwendung des Koeffizienten einer linearen Regression bei der Komponentengenerierung fließt diese Abhängigkeit in die Modellierung ein. Dadurch ist zwar die Anpassung der Komponenten an die ursprünglichen Objekte schlechter als bei der PCA, aber die Vorhersage der Merkmale wird genauer bzw. diese werden besser erklärt.

Als einzige nicht-parametrische Methode wurde in der vorliegenden Arbeit die Regression durch Gaußsche Prozesse (gaussian process regression, GPR)⁸⁸⁻⁹⁰ verwendet, welche nun kurz veranschaulicht werden soll.

Kann ein Objekt mehrere Eigenschaften besitzen bzw. eine Eigenschaft mit mehreren Ausprägungen, so treten diese verschiedenen Fälle mit jeweils einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auf. Die Gesamtheit dieses Auftretens stellt eine Wahrscheinlichkeitsverteilung dar. In den meisten realen Szenarien lässt sich eine solche Verteilung hinreichend gut durch eine Gaußkurve beschreiben.

Ein Gaußprozess zeigt analog dazu ebenfalls eine Wahrscheinlichkeitsverteilung. Diese beinhaltet jedoch nicht einzelne Zustände bzw. Punkte sondern Funktionen. Wenn man zwei Punkte aus einer

Datenmenge betrachtet, so können diese Punkte durch verschiedene Funktionen beschrieben werden wie z.B. eine Gerade oder eine quadratische Funktion. Dabei existiert für jede Funktion eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht nur die beiden Punkte sondern auch den Rest des Datensatzes beschreibt, was in der Gesamtheit den Gaußschen Prozess bildet. Dessen Vorhersage wird folglich genauer, je mehr Datenpunkte zur Verfügung stehen. Die Einbindung neuer Datenpunkte basiert dabei auf der sogenannten Bayes-Regel (Glg. 26)⁸⁹, welche die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses (A) als Folge oder im Zusammenhang mit einem anderen (B) beschreibt. Sie ist abhängig vom Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten der Einzelereignisse $P(A)$ und $P(B)$, sowie vom Kehrwert des Zusammenhangs zwischen A und B. Die GPR nutzt diese Regel, um die zur Verfügung stehenden Funktionen auf neue Datenpunkte abzugleichen und so die Wahrscheinlichkeitsverteilung zu korrigieren.

$$P(A|B)=P(B|A) \cdot \frac{P(A)}{P(B)} \quad (26)$$

Eine Gaußfunktion wird durch die Position und Intensität ihres Maximums sowie ihre Halbwertsbreite beschrieben. Analog dazu definiert man einen Gaußprozess über eine mittlere Funktion $m(x)$ und eine Kovarianzfunktion $k(x,x')$, welche den durchschnittlichen Abstand einer beliebigen Funktion von der mittleren beschreibt. Diese auch als Kernel bezeichnete Funktion bestimmt außerdem einen übergeordneten Trend, dem die zur Auswahl stehenden Funktionen folgen, d.h. ob sie primär linear verlaufen, periodisch sind oder z.B. ein starkes Rauschen aufweisen. An dieser Stelle kann der Anwender in die ansonsten nicht-parametrische Methode eingreifen und eventuell vorhandenes Wissen über das betrachtete System anwenden, indem eine passende Kernelfunktion ausgewählt wird. Die mittlere Funktion des Gaußprozesses ist also die Trendlinie die am wahrscheinlichsten den Zusammenhang zwischen den Objekten und den Merkmalen erklärt, und die durch den Kernel aufgespannte Abweichung davon stellt den möglichen Vorhersageraum für weitere Datenpunkte dar. Dabei verringert sich die Genauigkeit der Vorhersage mit dem Abstand zu den Trainingspunkten. Das bedeutet, dass auf halbem Weg zwischen zwei Punkten die mögliche Abweichung von der mittleren Funktion maximal ist. Dies gilt streng aber nur, wenn die beim Training verwendeten Daten exakt sind. Unterliegen sie einem Rauschen, so muss ein unabhängiger Korrekturfaktor dem Kernel hinzugefügt werden, das sogenannte Kovarianzrauschen $\sigma_n^2 \delta_{ii}$.⁹⁰

Um die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Funktionen berechnen zu können, müssen die Datenpunkte in eine Form überführt werden, die diese zusätzliche Information enthält. Hierzu wird bei der gaussian process regression (GPR)⁸⁸ zusätzlich zum eigentlichen Gaußprozess (GP) ein Satz von Basisfunktionen ($h(x)^T$) verwendet um die Inputvariablen x in einen neuen p -dimensionalen Objekt-Raum zu projizieren (Glg. 27). Der Faktor β stellt einen $p \cdot 1$ -Vektor von Basisfunktionskoeffizienten dar.

$$y(x)=(h(x))^T \cdot \beta + GP(m(x), k(x,x') + \sigma_n^2 \delta_{ii}) \quad (27)$$

Zusammenfassend erhält man durch die Regression mittels Gaußscher Prozesse aus einem Trainingsdatensatz ein Vorhersagemodell mit einer definierten Unsicherheit. Der Vorteil dabei ist die Möglichkeit, die Zulässigkeit des jeweiligen Modells eindeutig zu bewerten indem man prüft ob Testdaten innerhalb dieser Vorhersageunsicherheit liegen. Darüber hinaus kann mittels der

Kernelwahl vorhandenes Fachwissen in die Modellierung einfließen. Nachteil ist hier wie bei allen nicht-parametrischen Methoden die Notwendigkeit alle originalen Trainingsdaten zu verwenden, wodurch ein hoher Rechenaufwand erzeugt wird.

Von besonderem Interesse ist der Vergleich zwischen GPR, PLSR und LASSO. Die PLSR bewirkt eine Dimensionsreduzierung durch Einführung neuer Objekt-Vektoren, LASSO eliminiert Datenpunkte mit geringem Informationsgehalt und die GPR definiert eine Wahrscheinlichkeitsverteilung für mögliche Regressionskurven an den Datenpunkten. Jede dieser Methoden hat eigene Vor- und Nachteile. Die PLSR erkennt die primären Abhängigkeiten zwischen Objekten und Merkmalen und generiert so mit wenig Rechenaufwand gute Vorhersagemodelle. Allerdings werden die Zusammenhänge in einer neuen Dimension dargestellt was ihre Interpretation erschwert und Rückschlüsse auf die Objekte nicht zulässt. LASSO ermöglicht solche Rückschlüsse, da es die Zusammenhänge direkt herausstellt. Hierbei kann es jedoch passieren, dass geringfügige aber dennoch entscheidende Einflüsse ignoriert werden, besonders wenn es sich um indirekte Zusammenhänge handelt. Die GPR definiert Fehlergrenzen für Vorhersagen, wodurch Zusammenhänge klar erkennbar sind, und ermöglicht das Einfließen von Vorkenntnissen über das betrachtete System in den Modellierungsprozess. Diese Prozesse benötigen aber eine sehr hohe Rechenleistung und sind zeitaufwendiger als die anderen beiden Methoden.

3. Publikationen

Die vorliegende kumulative Dissertation enthält drei wissenschaftliche Publikationen, welche in den Kapiteln 3.2 bis 3.4 enthalten sind. Jedes Kapitel beginnt mit einer kurzen Vorstellung der entsprechenden Publikation sowie des Beitrags des Autors zu der enthaltenen wissenschaftlichen Arbeit. Kapitel 3.1 stellt einen Überblick über die in den Publikationen verwendeten analytischen Methoden dar.

3.1. Verwendete analytischen Arbeitsmethoden

In Kapitel 2.2. wurden die theoretischen Grundlagen der in dieser Arbeit beschriebenen analytischen Methoden behandelt. Im Folgenden soll die experimentelle Umsetzung dieser zusammengefasst werden. Dabei wird vorrangig darauf eingegangen, welche konkreten Methoden für die Durchführung der jeweiligen Messungen verwendet wurden. Gegebenenfalls werden Modifikationen der genutzten Analysengeräte beschrieben. Neben den experimentellen Techniken werden die verwendeten Methoden der multivariaten Datenanalyse aufgezählt und ihre Bedeutung für die vorliegende analytische Fragestellung angerissen.

Für die Untersuchung von Böden wurden in der vorliegenden Arbeit Proben von zwei verschiedenen Feldern gesammelt und im Labor mittels eines Handheld-LIBS-Gerätes vermessen. Für diese Messungen wurden die Proben in Form von homogenisierten luftgetrockneten Tabletten verwendet. Dies diente vorrangig der Erzeugung einer gleichmäßigen Elementverteilung, um so die statistischen Schwankungen der gewonnenen Spektren vorrangig als Abhängigkeit von den Fluktuationen des erzeugten Plasmas zu beschreiben. Reale Feldmessungen auf Testflächen waren zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch in Planung.

Das verwendete kommerziell erhältliche Handheld-Spektrometer (Z 300, SciAps Inc., Woburn, MA) wurde ursprünglich für die Analyse von Metallen in der Schrottsortierung konzipiert. Es verfügt über verschiedene Eigenschaften, welche bei der vorliegenden Problemstellung vorteilhaft sind. Das Gerät kann durch sein Pistolengriffdesign und geringes Gewicht (ca. 1.8 kg) leicht in einer Hand getragen werden. Die Bedienung erfolgt über einen Touchscreen mit App-basierter Nutzeroberfläche und die Daten werden direkt als LIB-Spektren und als Substanztabellen ausgegeben. Die Spektren können über einen USB-Anschluss in Form von .csv-Dateien exportiert werden. Eine große Spektralbreite (190 – 950 nm) bei gleichzeitiger guter Auflösung (0.1 nm) wird durch drei parallel arbeitende CCD-Spektrometer gewährleistet. Um Mikroinhomogenitäten der Probenoberfläche zu erfassen, ist das Gerät mit einer beweglichen Laseroptik ausgestattet, was ein definiertes Abrastern der Oberfläche erlaubt. Das für die hier durchgeführten Messungen verwendete Raster von 8x8 Schüssen hat eine Größe von 1 mm². Die aus Sicherheitsgründen relativ geringe Leistung des Ablationslasers (7.5 mJ) wird durch die Verwendung von Argonpulsen kompensiert. Eine Argonatmosphäre im Bereich des erzeugten Plasmas erhöht die Intensität der Spektrallinien um den Faktor Zehn. Das Argon wird dabei durch eine im Griff befindliche Kartusche bereitgestellt, oder kann über einen modifizierten Anschluss eingebracht werden. Zusätzlich zur geringen Energie ist der Laser mit einem optischen Sicherungssensor versehen, welcher den Laserpuls nur erlaubt, wenn sich ein Objekt im Fokusbereich des Sensors und damit des Lasers befindet. Somit zeichnet sich das Gerät durch eine simple und sichere

Handhabung sowie durch eine ausreichend gute Analysenqualität aus, um die Messungen an komplexen Matrizes wie Böden durchführen zu können.

Für die Auswertung der erhaltenen Spektren bezüglich verschiedener Bodeneigenschaften bzw. Nährstoffgehalte wurden in der vorliegenden Arbeit drei Methoden der multivariaten Datenanalyse verwendet. Dabei handelte es sich um PLSR, LASSO und GPR. Die erhaltenen Ergebnisse wurden miteinander verglichen, wobei die PLSR als Referenz verwendet wurden, da diese Methode im Bereich der Laser-induzierten Breakdown Spektroskopie die gängigste darstellt.

Zum Nachweis von Schimmelpilzen wird in dieser Arbeit der Headspace von definiert kontaminierten Proben untersucht. Dies waren sowohl Agar-Substrate als auch Gerstenkörner, welche mit Sporensuspensionen bekannter Schimmelpilze versetzt wurden. Bei den für die Detektion relevanten Analyten handelt es sich um flüchtige Substanzen, welche von den Schimmelpilzen freigesetzt werden. Etwa 10 g der jeweiligen Proben wurden für die Untersuchung in gasdichten Glasgefäßen bereitgestellt. Um die Analyten vom Headspace auf die Trennsäule des jeweiligen Gaschromatographen zu überführen, wurde eine Festphasenmikroextraktion (SPME) durchgeführt. Die dabei verwendete SPME-Faser war mit einer Dreifachbelegung versehen, bestehend aus Divinylbenzen, Carboxen und Polydimethylsiloxan.

Drei verschiedene analytische Aufbauten wurden zur Bestimmung der flüchtigen Schimmelpilzmetabolite (mVOC) verwendet. Ein GC-EI-MS-System wurde zur Identifizierung der mVOC genutzt. Dessen Substanzvorschläge wurden mit einem GC-APCI-MS-Aufbau verifiziert. Schließlich diente eine GC-APCI-IMS-Kopplung als Testsystem für eine mögliche vor-Ort-Analytik. Der Abgleich der jeweiligen Chromatogramme erlaubt die Korrelation der Ergebnisse dieser Messungen. Dies erfolgte anhand der Retentionsindizes einer Standardmischung bekannter mVOC.

Während es sich bei dem EI-System um einen kommerziellen Aufbau handelt, wurden die Kopplungen der APCI-Geräte mit den zugehörigen Gaschromatographen in Eigenbau erstellt. Für das Massenspektrometer wurde eine Ionisationskammer entwickelt, welche dazu diente die Überführung der Ionen vom Atmosphärendruck ins Vakuum zu ermöglichen. Dies erfolgte über elektronische Linsen, die die Ionen in Richtung der Eingangskapillare des Massenspektrometers fokussieren. Darüber hinaus diente die Kammer als definierter Reaktionsraum für die Ionisation unter Abschirmung gegen äußere Störeinflüsse. Eine beheizte Überführungskapillare stellte die Verbindung zwischen Gaschromatograph und Ionisationskammer dar. Bei dem verwendeten IM-Spektrometer handelt es sich um ein kommerzielles Handheld-Gerät, welches für die Kopplung mit dem Gaschromatographen modifiziert wurde. Die Probenzufuhr wurde mit einer Überführungskapillare ausgestattet und der interne Gaskreislauf durch externe Anschlüsse ergänzt um die notwendigen Drücke und Gasflüsse im Gerät an die Kopplung anzupassen.

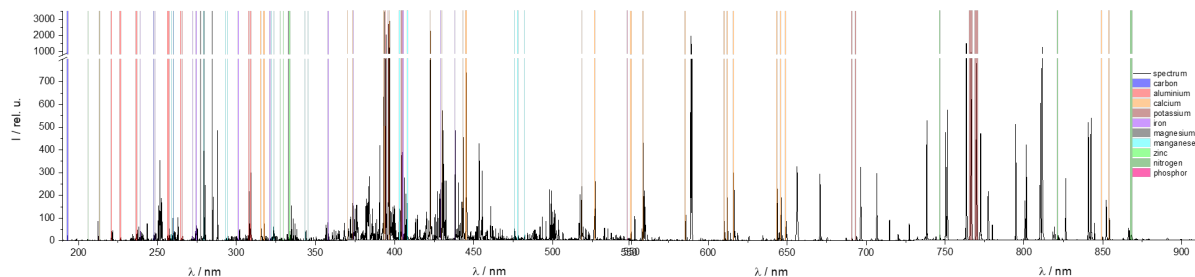
Neben den beschriebenen Messungen zur Detektion einer Schimmelpilzkontamination wurde mit dem erwähnten APCI-Massenspektrometer auch ein CID-Experiment als proof-of-principle an einigen der Standardsubstanzen durchgeführt.

Die Auswertung der Messungen zu den Schimmelpilzmetaboliten erfolgte größtenteils durch Datenbank-Vergleiche und manuelle Korrelationen zwischen den verschiedenen Geräten. Daneben wurde auch die Hauptkomponentenanalyse angewendet, um exemplarisch verschiedene Schimmelpilzspezies zu differenzieren. Daran sollte geprüft werden, ob maschinelles Lernen bei der Detektion bzw. Identifizierung von Schimmelpilzkontaminationen sinnvoll eingesetzt werden kann.

3.2. Detektion von Bodennährstoffen für den Präzisionsackerbau mit LIBS und multivariater Datenanalyse

„ Soil nutrient detection for precision agriculture using handheld laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and multivariate regression methods (PLSR, Lasso and GPR)“

Erler, A.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Gebbers, R.
Sensors ...



Inhalt der Publikation und Beitrag des Autors:

In dieser Publikation wurden Bodenproben mittels der Laser-induzierten Breakdown Spektroskopie untersucht. Ziel war die Detektion verschiedener Nährstoffe anhand ihrer Emissionslinien und die Erstellung einer schnellen automatisierten Auswertung durch verschiedene Methoden der multivariaten Datenanalyse. Die Bodenproben wurden von den Projektpartnern des ATB zur Verfügung gestellt. Ich habe die luftgetrockneten Proben homogenisiert, mit einer definierten Feuchtigkeitsmenge versehen und zu Tabletten gepresst. Diese habe ich mit einem Handheld-LIBS-Spektrometer vermessen. Die Spektren wurden von mir ausgewertet, inklusive der Zuordnung der Nährstoffpeaks. Die erhaltenen Daten habe ich mittels MatLAB für die MVA aufbereitet. Diese wurde von Dr. Toralf Beitz durchgeführt. Ich war an der Diskussion der Ergebnisse beteiligt und habe die hier enthaltenen Abbildungen erstellt. Der Schreibprozess fand in enger Zusammenarbeit mit den Koautoren statt.

Soil nutrient detection for precision agriculture using handheld laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and multivariate regression methods (PLSR, Lasso and GPR)

Alexander Erler ¹, Daniel Riebe ¹, Toralf Beitz ¹, Hans-Gerd Löhmannsröben ^{1,*} and Robin Gebbers ²

¹ University of Potsdam, Physical Chemistry, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam, Germany

² Leibniz Institute for Agricultural Engineering and Bioeconomy (ATB), Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam, Germany

Abstract:

Precision agriculture (PA) is strongly relying on spatially differentiated sensor information. Handheld instruments based on laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) are a promising sensor technique for the in-field determination of various soil parameters. In this work, the potential of handheld LIBS for the determination of the total mass fractions of the major nutrients Ca, K, Mg, N, P and the trace nutrients Mn, Fe was evaluated. Additionally, other soil parameters, such as humus content, soil pH value and plant available P content, were determined. Since the quantification of nutrients by LIBS depends strongly on the soil matrix, various multivariate regression methods were used for calibration and prediction. These include partial least squares regression (PLSR), least absolute shrinkage and selection operator regression (Lasso), and Gaussian process regression (GPR). The best prediction results were obtained for Ca, K, Mg and Fe. The coefficients of determination obtained for other nutrients were smaller. This is due to much lower concentrations in the case of Mn, while the low number of lines and very weak intensities are the reason for the deviation of N and P. Soil parameters that are not directly related to one element, such as pH, could also be predicted. Lasso and GPR yielded slightly better results than PLSR. Additionally, several methods of data pretreatment were investigated.

Keywords: LIBS, Lasso, PLS regression, Gaussian processes, soil, precision agriculture, nutrients

1. Introduction

Soils usually exhibit an inhomogeneous distribution of chemical, physical and biological soil properties. On agricultural land, this creates spatial variations of the qualities relevant for soil fertility and related management measures such as tillage, seeding, and fertilization. Chemical soil fertility parameters include the total contents of the main nutrients, such as potassium, magnesium, calcium, nitrogen and phosphorus, the total contents of the trace nutrients such as iron and manganese, the plant availability of these nutrients, the humus content and the soil pH value. The usual, uniform fertilization of the fields can lead to partial over- or underdosing. Overdosing case can lead to exposure of surface and groundwater. Underdosing can result in an under-supply with nutrients, and thus to losses in yield and quality at the site. The concept of site-specific plant production (precision agriculture) can remedy this situation. The basic idea is to record the spatial variations within a field and to react to them in an appropriate way. Precision agriculture therefore requires spatially differentiated information which needs to be obtained in a cost and time efficient manner [1]. Instead of time-consuming and expensive soil sampling with consecutive laboratory analysis, in- or ex-situ soil sensors can be used. However, only a few sensor technologies, such as geoelectrical, potentiometric pH, gamma-ray and spectral-optical sensors, are currently used [2–4].

A promising method, which is potentially well suited for the in-field determination of total contents of elements in soils, is laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). LIBS is an optical emission spectroscopy technique [5–9]. An intense pulse of laser radiation, typically of nanosecond duration, is focused onto the sample, where it ablates material from the surface and creates a microplasma. The plasma, in turn, excites atoms and atomic ions which emit radiation specific to the elemental composition of the sample. The technique can thus be used for simultaneous multi-element analysis. In comparison to X-ray fluorescence (XRF), which also gains interest as method for rapid soil analysis [10], the whole range of elements, including the light elements, is accessible by LIBS. This allows the direct (in situ) analysis of macro and trace nutrients because no or only minimal sample preparation is necessary. Additionally, LIBS measurements are much faster than XRF measurements. The laser beam is usually focused to a spot with a diameter between 10 – 500 μm in order to reach the threshold for plasma generation. Therefore, the soil heterogeneity at the micrometer scale has to be considered for obtaining representative results. With today's technology robust and portable LIBS systems can be build. These characteristics of LIBS make it a suitable tool for cost-effective and fast on-site analyses, compared to the practice of laboratory analyses, and make LIBS appear particularly well suited for the spatially resolved soil analysis of agricultural fields.

Ablation and plasma excitation are both highly complex phenomena. Since the interaction of the laser with the sample is influenced by the sample composition, a matrix-dependence of the signal response is observed. These matrix effects lead to a non-linear relation between the elemental content and the intensity of the spectral line. Matrix effects can have different sources, including the laser-to-sample coupling, collisional interactions within the plasma, or the plasma temperature, which influences the ratio of neutral and ionized species. These matrix effects and spectral interferences were already investigated for Pb determined in different types of soil [11]. The study demonstrated that spectral interferences from main components (Ca, Fe, Ti, Mg) and trace components (Mn, Nb, Zr) were a reason for significant differences between the univariate calibration models. In another work, the influence of the moisture content, the compressive force for sample pelleting and the total content of easily ionized elements on the ionization equilibrium were characterized [12].

Depending on the calibration effort, the elements can be determined qualitatively or quantitatively. While univariate calibration suffers from the matrix effects and corresponding calibration models often cannot be transferred to other soil types, multivariate analysis of whole spectra intrinsically takes matrix effects into account. A common, robust and reliable multivariate method used for calibrating LIBS for soil analysis is partial least squares regression (PLSR). PLSR is a method of dimensional reduction, which first identifies a new reduced set of features that are linear combinations of the original features, and then fits a linear model via least squares using these new features. However, this and similar methods have two limitations. First, all spectral channels are used, although many channels only contribute noise. Second, a spectrum can consist of several hundred lines. It is interesting to know which lines contribute to the analysis of the element investigated. Methods which have the ability to reduce the number of input variables (spectral channels) and to correlate a smaller number of input variables are better suited for model interpretation [13]. One method enabling this reduction is the least absolute shrinkage and selection operator (Lasso) [14]. Lasso is very similar to least squares regression, except that it includes a penalty term of the ℓ_1 norm. This penalty term limits the absolute sum of all coefficients in the linear regression equation and shrinks the coefficient estimates generally towards zero. Furthermore, the penalty term of the ℓ_1 norm has the property of forcing most coefficients to zero. This often leads to regression functions with drastically reduced sets of predictors. Multivariate analysis by PLSR and Lasso was already evaluated for LIBS investigations of geological samples [15–17]. Both methods yield similar results. However, Lasso enables a better interpretation. In addition to PLSR and Lasso, a broad spectrum of machine learning methods such as artificial neural networks (ANN) and support vector machines (SVR) have been applied to the quantification and classification of geological samples investigated by LIBS. A method seldom used with LIBS is Gaussian process regression (GPR) [18]. In contrast to PLSR and Lasso, GPR is a non-parametric method. It is a local regression approach, which uses a kernel for weighting neighboring observations in the estimation. Compared to other kernel methods, such as splines and support vector machines, GPR is slower but yields properly tuned probabilistic outputs and is sometimes more robust and flexible.

While publications on large-scale field mapping by LIBS are scarce [19], the detection of soil nutrients in the laboratory has already been demonstrated in a series of publications [20]. For example, in a study by Guo et al., 13 different elements in 17 different standard soils were determined by LIBS applying PLSR and SVR [21]. Single pulse and double pulse LIBS were compared at the determination of K, Ca, Mg, Fe, Na and Mn in 63 soil samples applying PLSR and SVR [22]. Further work describes the application of the laser ablation-LIBS method for the determination of Fe, Mn, Mg, Ca, Na and K in soil samples [23], the univariate analysis of Ca, Mg, P, Fe and Na [24], and the analysis of Ba, Co, Cu, Mn, Ni, V and Zn applying a multilayer perceptron ANN [25]. A special focus was the determination of the organic, inorganic and total carbon content for characterizing the soils in agriculture and the carbon sequestration potential. These investigations started with univariate analysis of the total carbon content using the two C lines at 193 nm [26,27] and 247.9 nm [28]. Later, multivariate methods such as PLSR [29–31], Lasso and multivariate regression with covariance estimation [15,32] were applied, which also allowed the differentiation of inorganic and organic C. Multivariate approaches were also used to determine further soil parameters such as soil pH [33].

While most work on LIBS was performed with laboratory instrumentation, a demonstration of the feasibility of using mobile or handheld equipment is necessary for a future in-field application of LIBS. First field-portable instruments were introduced and characterized in 2001 [34] and 2005 [35]. With the commercial availability of handheld LIBS instruments utilizing microchip lasers with pulse energies

around 6 mJ, and broadband spectrometers covering a spectral range from 190 – 950 nm, geological and environmental applications became possible. In these works, the applicability of the handheld instruments for geochemical fingerprinting [36], calibration curves of Cu and Al alloys [37] and geological discrimination of, e. g., meteors and fakes [38,39] were investigated. Further applications are described in two reviews on portable spectroscopy [40,41].

This work had three objectives. First, the potential of a handheld instrument for the determination of a broad range of major (Ca, Mg, K, P and N), and minor (Mn and Fe) nutrients was investigated. Furthermore, the capability of detecting non-elemental soil parameters, such as the humus content and the soil pH, was assessed. A first screening of the potential of measuring the plant available content of P was carried out. Second, three different multivariate regression methods for the nutrient determination in soils using LIBS were evaluated. The methods are PLSR, Lasso and GPR. Third, different methods of data preparation with the aim of improving the results of multivariate regressions were investigated. Even though it is known that data pre-processing can have a large impact on the calibration performance, there is no general consensus for a unified procedure.

2. Materials and Methods

2.1. Soil sampling, reference analytics and sample preparation

The samples were taken from the topsoil (0 to 30 cm) of two agricultural fields near Wilmersdorf (Germany, 53° 06' N, 13° 54' E). The main parent material of the soil consists of calcareous glacial till with a cover of non-stratified sand and stones. The soil texture varies between sand, loamy sand and sandy loam in the topsoil. 68 and 69 samples were taken from the fields. The sampling procedure and sample selection were described earlier [42]. All 137 samples were characterized by reference analytics. While the total mass fractions of the elements (Ca, K, Mg, N, P, Fe, Mn, Al) were determined by wet digestion and ICP-OES, the mass fractions of P available for plants were determined after double lactate extraction, the humus content by the determination of the organic carbon and the pH value by suspension of the soil in aqueous CaCl₂ solution and pH electrode measurement.

Soil pellets were produced by taking 3 g of soil sample and mixing with 90 µl water to establish a standardized moisture. Then, the soil samples were homogenized using a ball mill (MM 400, Retsch, Hahn, Germany) and pressed to pellets at 50 kN without applying binding agents (TP 40, Herzog Maschinenfabrik, Osnabrück, Germany).

2.2. LIBS apparatus

The pellets were measured using a LIBS handheld instrument (Z-300, SciAps, Woburn, MA). The spectrometer has a detection range of 190 – 950 nm. The integrated laser emits radiation at a wavelength of 1064 nm, with a repetition rate of 10 or 50 Hz and ca. 7.5 mJ pulse energy. For the measurements described in this paper, a repetition rate of 10 Hz was used. Additionally, the device provides an Ar gas purge to remove ambient air and enhance the LIBS signals. The measurements consisted of 64 shots in an 8 x 8 grid of approximately 1 mm² area size on the surface of the pellet. The measurements were repeated three times per pellet in order to obtain a representative (averaged) spectrum of the sample.

2.3. Preprocessing of data

Variance reduction. The LIBS spectra show relatively large fluctuations of their intensities. The reasons for these variations are, e.g., the normal stochastic plasma fluctuations and variations due to micro inhomogeneities in the ground soils pressed to pellets. One possibility for the reduction of variations is averaging. Another way is variance reduction based on principle component analysis (PCA) proposed by Pořizka et al. [43]. In this method, the Euclidean distance of a data point to the center of the principal component (PC) space constructed by the first three principal components is determined. The method removes a predetermined percentage of spectra with the largest Euclidean distances before averaging the remaining spectra of one sample point. In this approach, the coefficients of determination of PLSR were compared to assess the effect of the removal of none, 5 %, 20 % and 50 % of the spectra with the largest distances to the center of gravity in PCA. Upon the removal of 5 %, 20 % or 50 % of the spectra, all remaining spectra of one data point were averaged.

Background correction and normalization. A top-hat filter [44] with a structure element length of 20 data points was used for background correction. Standard normal variate (SNV) normalization was used [45].

Data reduction. In a field measurement campaign, a huge amount of data is potentially generated. LIBS spectra contain a large number of data points that may not all be relevant. Besides creating unnecessary computational burden, irrelevant data can negatively affect calibration and prediction. The approach for data reduction used here is based on background correction followed by integration of all lines in the spectrum. Background correction and integration of spectra were performed in the open source software OpenMS [46] which was developed for mass spectrometric data processing. One advantage of this software is the option of batch processing that allows the automatic processing of large amounts of data. The top-hat filter was used for background correction. The integration tool includes a threshold parameter which determines the signal-to-noise ratio at which the lines are integrated, and thus determines the number of lines selected and the extent of data reduction. While a high threshold can decrease the number of lines to the most intense lines, a low threshold can include the noise of the baseline. Therefore, five different thresholds were selected, which consider both extreme cases and three levels in between.

2.4. Data analysis by multivariate methods

Three multivariate methods were used for obtaining calibration models. PLSR is widely applied in the LIBS community and can be regarded as a reference method. Lasso regression is a shrinkage method which constrains the coefficient estimates and shrinks coefficient estimates that do not significantly contribute to the correlation towards zero. This enables a robust regression and a simplified interpretation of the coefficients. In this work, the number of coefficients was always reduced to the minimum number possible (Min) and the number necessary for an error one standard deviation above that minimum (1SE). GPR, also known as kriging in geostatistics, is a method rarely applied in LIBS [47]. GPR models are nonparametric kernel-based probabilistic models.

All methods were implemented in Matlab (Version 2019a, MathWorks, Natick, MA, USA). PLSR was carried out with *plsregress* and GPR was based on *fitrgp*. Both functions are included in Matlab's Statistics and Machine Learning Toolbox. Lasso regression was performed with the *glmnet* function, which is part of a package provided by J. Friedman et al. [48]. Different validation procedures were tested, namely 10-fold cross-validation, random splitting of the 137 samples into a 50 % training and a

50 % test data set (*cvpartition* function in matlab) as well as using data of the first field as training data (50 %) and data of the second field as test data (50 %).

3. Results

The focus of this work was the characterization of the potential of a handheld LIBS instrument for the determination of a broad range of major (Ca, Mg, K, P and N), and minor (Mn and Fe) nutrients in soils. These elements are among the most important nutrients for plants in agriculture. A typical LIBS spectrum of the soils recorded with the handheld instrument is displayed in Fig. 1. The information of this spectrum is dense and its structure is complex. Important lines of the elements investigated are marked by colored lines. The emissions are found within the whole spectral range of the handheld spectrometer between 190-950 nm. The lines of all elements in the spectrum except N and P appear in high intensities.

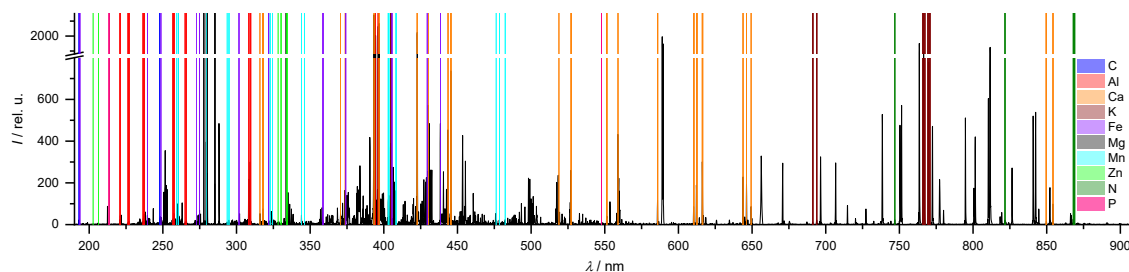


Figure 1. Representative LIBS spectrum of a soil sample of the field near Wilmersdorf, lines of the elements investigated are marked by colored lines (labels on the right).

The most intense lines of the observed nutrients and the average mass fractions of the nutrients obtained by reference analytics (ICP-OES) are summarized in Tab. 1. The mass fractions of all nutrients cover almost 2 orders of magnitude. This represents a challenge for an analytical investigation. For the evaluation of the handheld instrument, the variation of environmental parameters, such as moisture, grain size distribution (texture), and general heterogeneity of the soil, was reduced by sample pretreatment. This included drying, grinding, homogenizing and pressing the soil into pellets.

Though univariate calibration can be applied successfully to samples from a small geographic region, e.g. from one field, multivariate calibration methods consider matrix effects to a greater extent, often provide better and more generalized calibration models as well as a better prediction of unknown soil samples. In this work, three different multivariate methods, namely PLSR, Lasso and GPR, were characterized and compared. The regression models were validated in three different ways:

1. 10-fold cross validation as a general standard,
2. statistical splitting of the data set in 50 % training data and 50 % test data for comparison to the third validation scheme,
3. data from field 1 for training and data from field 2 for testing (splitting in 50 % training and 50 % test data).

The latter validation scheme is considered a real-world scenario and gives an indication for the generalization of the calibration model and its possible application on unknown fields.

Table 1. Summary of the lines and the average mass fractions of the nutrients determined by reference analytics ICP-OES, signal-to-noise ratios of very weak lines in parentheses

Nutrients	Observed lines, λ / nm	Average mass fractions / ppm
Ca	315.9, 317.9, 370.6, 373.7, 393.3, 396.8, 422.7, 430.2, 443.5, 445.5, 518.9, 527.0, 551.4, 558.9, 585.8, 610.3, 612.2, 616.2, 643.9, 646.2, 649.4, 849.8 (3), 854.2	4950
K	404.6, 691.1 (2), 693.9 (4), 766.5, 769.9	1280
Mg	278.0, 279.5, 280.2, 285.2, 333.5	1450
N	746.8 (5), 821.6 (4), 868.3 (4)	917
P	213.6 (<2), 547.7 (<2)	372
Fe	193.6 (<2), 239.5, 248.8, 272.7 (3), 274.9, 301.8 (<2), 321.7 (2), 358.6 (4), 374.2, 405.5, 428.5, 438.4	10400
Mn	259.3, 279.8, 293.7, 294.8, 322.9 (4), 324.2, 344.1, 346.1, 403.3, 408.3, 476.3 (4), 478.4 (4), 482.4 (5)	249
C	193.1 (5), 247.8	
Al	220.8, 221.1, 226.4 (2), 226.9 (3), 236.7, 237.3, 256.8, 257.5, 265.2 (3), 266 (4), 308.2, 309.3, 394.4, 396.2	6450

2.1. Calcium

The best overall results were obtained for calcium, which had the third largest average mass fraction behind Fe and Al (see Tab. 1). Some validation results of the three multivariate regression methods and the different validation schemes are shown in Fig. 2. A more detailed summary is given in Tab. 2 along with the calibration performance for the other nutrients. 10-fold cross-validation of the three multivariate methods yields roughly similar results. PLSR is the most common method and can be regarded as the standard. Lasso and GPR are more rarely applied methods, which are compared with this standard. The coefficients of determination (R^2) and root mean squared errors of prediction (RMSEP) are used as quantitative measures for the comparison of the three methods. Due to the wide range of Ca mass fractions of over two orders of magnitude, multivariate regressions were performed with both logarithmic (only for Ca) and non-logarithmic mass fractions. Consequently, R^2 and RMSEP (Tab. S1 in Suppl. Mat.) are reported for both types of regression. 10-fold cross-validation of PLSR of nearly 137 spectra yields good figures of merit (Fig. 2c), i.e. in the case of logarithmic ($R^2(\text{Ca}, \text{PLSR}) = 0.87$) and non-logarithmic mass fractions ($R^2(\text{Ca}, \text{PLSR}) = 0.86$). The corresponding coefficients of determination obtained for Lasso were slightly worse ($R^2(\log, \text{Ca}, \text{Lasso}) = 0.85$ and $R^2(\text{non-log}, \text{Ca}, \text{Lasso}) = 0.84$), since Lasso radically reduces the number of predictors (Fig. 2a). GPR as a non-parametric method was the best method for the determination of Ca mass fractions ($R^2(\log, \text{Ca}, \text{GPR}) = 0.89$, $R^2(\text{non-log}, \text{Ca}, \text{GPR}) = 0.83$) (Fig. 2b).

Scenario 2 is closely related to validation scheme 3, but uses a randomly chosen selection of the samples into a split data set using 50 % of the spectra for training and 50 % of the spectra for validation. PLSR for the test data yields a good prediction, $R^2(\log, \text{Ca}, \text{PLSR}) = 0.89$ (5 components, correlation not shown), which is similar to 10-fold cross validation.

A possible real-world scenario is using the samples of field 1 for calibration and applying this calibration to the prediction of the soil samples of another field (field 2). A successful application would reduce the calibration effort for extending the application of LIBS to further fields which would facilitate the adaption of the method. This transfer is very challenging due to the strong matrix effects encountered in soils. The application of the calibration to the test data of field 2 (Fig. 2d) shows a surprisingly good

prediction with $R^2(\text{Ca, PLSR}) = 0.90$, which allows a relatively precise estimation of Ca contents. These coefficients of determination are very similar to the corresponding values of the split data set obtained by random selection of sample points. This is an indication of similar chemical and physical soil properties (matrix effects) of the second field.

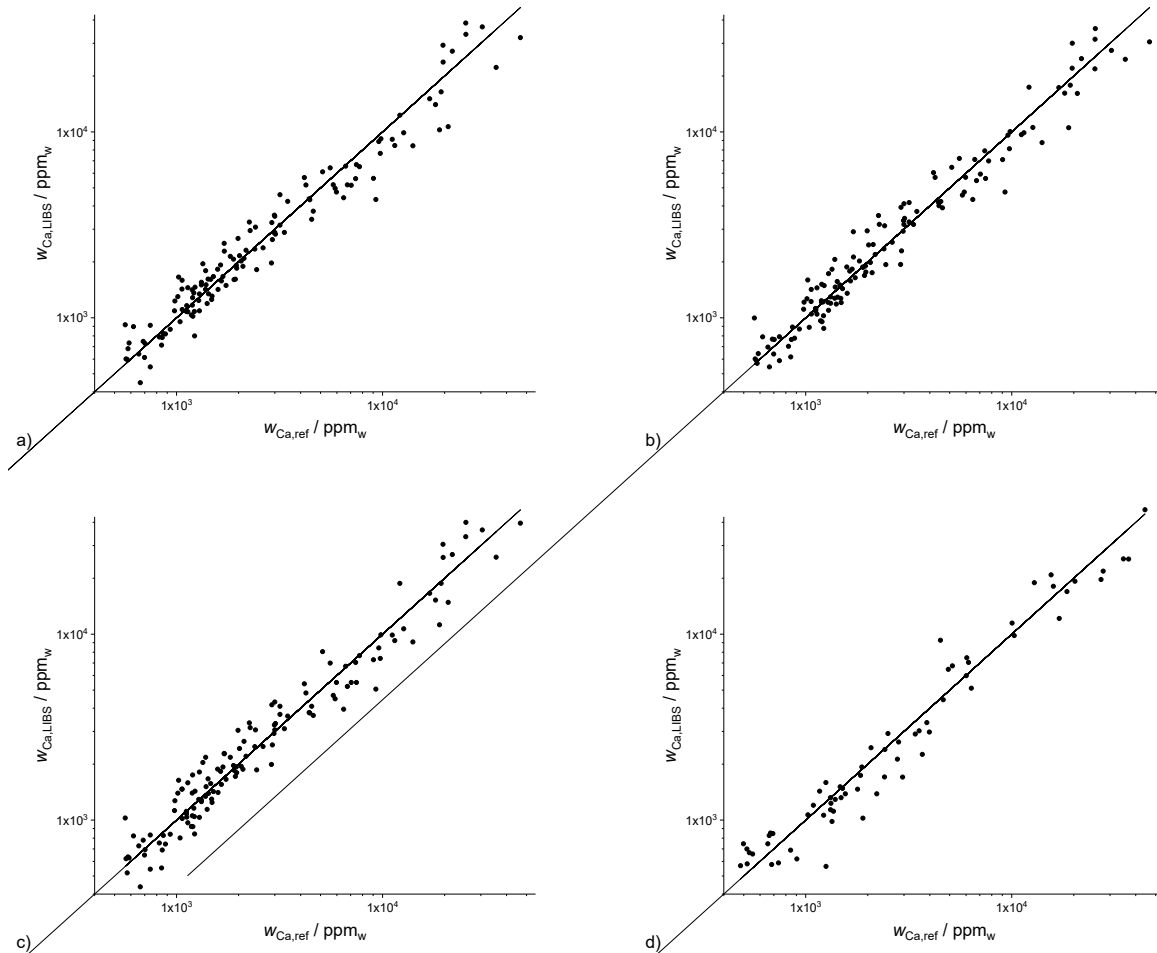


Figure 2. Results of 10-fold cross validation of Ca data for different multivariate methods (a) Lasso regression ($R^2(\log) = 0.85$), (b) GPR ($R^2(\log) = 0.89$), (c) PLSR (7 components, $R^2(\log) = 0.87$), and (d) PLSR of second field (6 components, $R^2(\log) = 0.90$).

2.2. Magnesium and potassium

While the averaged Ca mass fraction in the soils investigated is 4950 ppm, the averaged mass fractions of Mg and K are 1450 ppm and 1280 ppm and therefore significantly lower. This corresponds to lower line intensities in the LIBS spectrum (Fig. 1). The coefficients of determination of the PLSR (10-fold CV) is $R^2(\text{Mg, PLSR}) = 0.79$ for Mg (Fig. 3), which is lower than the Ca value. The value of $R^2(\text{K, PLSR}) = 0.64$ for K is even lower. The scattering of the data points increases for K but allows a rough estimate. Beside the lower mass fractions compared to Ca, the decreased predictive power in the case of Mg and K can also be attributed to the lower number of lines ($N(\text{Mg}) = 5$ and $N(\text{K}) = 5$ vs. $N(\text{Ca}) = 23$) observed in the LIBS spectrum. Furthermore, the two strong K lines at 766.4 nm and 769.9 nm are influenced by self-absorption, which makes a linear regression more difficult. In addition to these reasons, the dynamic range of the mass fractions of Mg and K is less than one order-of-magnitude and therefore much smaller than the corresponding mass fraction range of Ca, which covers two orders-of-magnitude.

The coefficients of determination of the three multivariate methods (10-fold CV) are $R^2(\text{Mg, PLSR}) = 0.79$ (Fig. 3), $R^2(\text{Mg, Lasso}) = 0.75$ and $R^2(\text{Mg, GPR}) = 0.78$ for Mg as well as with $R^2(\text{K, PLSR}) = 0.64$, $R^2(\text{K, Lasso}) = 0.65$ and $R^2(\text{K, GPR}) = 0.66$ for K and thus quite similar. While PLSR yields the best prediction for Mg followed by GPR and Lasso, GPR is best for K followed by Lasso and PLSR. However, the differences between the results of the three methods are negligible.

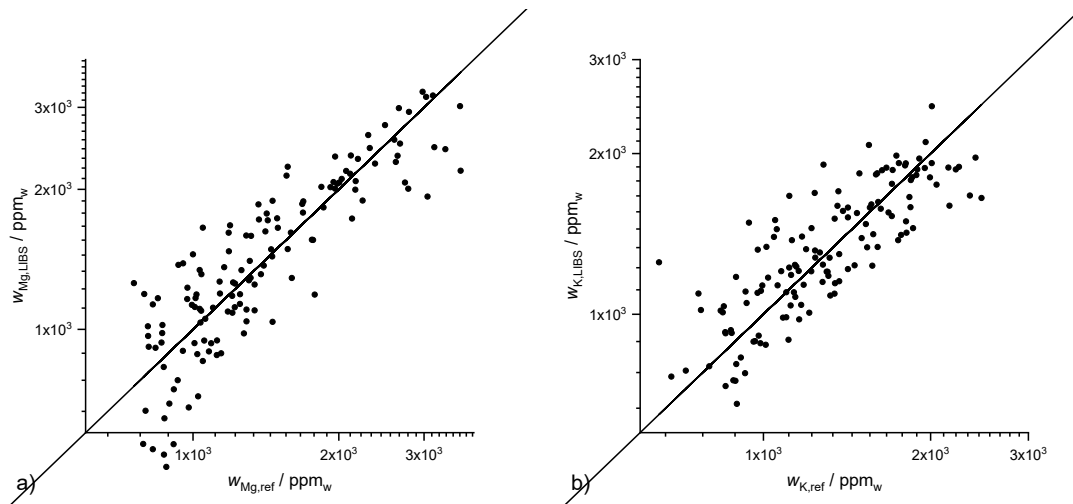


Figure 3. Results of 10-fold PLSR cross validation for (a) Mg with $R^2(\text{Mg, PLSR}) = 0.79$, and (b) K with $R^2(\text{K, PLSR}) = 0.64$.

2.3. Nitrogen and Phosphorus

Nitrogen and phosphorus are two very important nutrients. Their average contents in the Wilmersdorf fields are relatively low compared to other elements, namely 917 ppm for nitrogen and 372 ppm for phosphorus. Due to these low mass fractions and the low line strengths of both elements, only a few weak lines for both elements could be assigned, three for nitrogen and two for phosphorus. However, it cannot be excluded that these lines are superimposed with signals from other elements, due to the many lines in the spectrum and the limited resolution (> 0.1 nm) of the spectrometer. Though a robust prediction should not be expected with these weak lines, Lasso yielded good predictions for N with $R^2(\text{N, Lasso}) = 0.65$ (Fig. 4) and a qualitative correlation between predicted and observed P values with $R^2(\text{P, Lasso}) = 0.21$. Similar coefficients of determination were obtained with PLSR: $R^2(\text{N, PLSR}) = 0.51$ and $R^2(\text{P, PLSR}) = 0.14$ as well as GPR with $R^2(\text{N, GPR}) = 0.51$ and $R^2(\text{P, GPR}) = 0.28$. The prediction results of the three methods were similar.

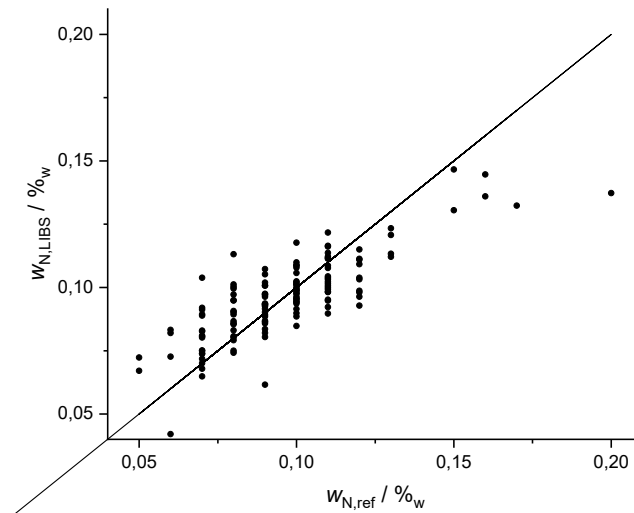


Figure 4. Results of 10-fold Lasso cross validation for nitrogen, $R^2(\text{N, Lasso}) = 0.65$, reference data of nitrogen is coarsely resolved (in classes of $\Delta 0.01\%$).

2.4. Minor nutrients

The minor nutrients Mn and Fe were also investigated. Their average mass fractions of 10400 ppm for Fe and 249 ppm for Mn vary strongly between both elements. The highest coefficients of determination are obtained for Fe with $R^2(\text{Fe, Lasso}) = 0.76$ (Fig. 5a) followed by Mn with $R^2(\text{Mn, Lasso}) = 0.55$ (Fig. 5b). This ranking corresponds to the order of the mass fractions. In addition to the low mass fraction of Mn, the mass fraction range was also very narrow e.g. compared to Ca. This is the reason for the decreasing coefficient of determination. The coefficient of determination obtained for Fe by PLSR was $R^2(\text{Fe, PLSR}) = 0.77$ and by GPR was $R^2(\text{Fe, GPR}) = 0.72$ which is similar to Lasso. By contrast, coefficients of determination for Mn vary strongly between the three methods: $R^2(\text{Mn, Lasso}) = 0.55$, $R^2(\text{Mn, PLSR}) = 0.21$ and $R^2(\text{Mn, GPR}) = 0.13$.

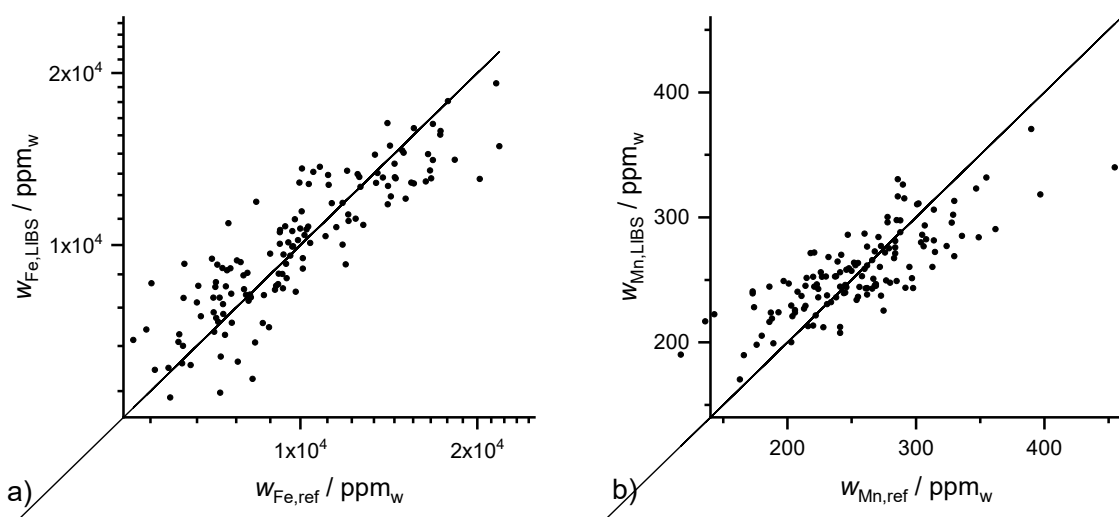


Figure 5. Results of 10-fold Lasso cross validation for (a) Fe with $R^2(\text{Fe, Lasso}) = 0.76$ and (b) Mn with $R^2(\text{Mn, Lasso}) = 0.55$.

2.5. Aluminium

Al was chosen as a constituent of most minerals in soils. Furthermore, it can induce root damage and plant growth reduction in acidic soils. The Al content of 6447 ppm in the investigated soils is the second highest of all elements investigated. Accordingly, the regression coefficients obtained with the three methods are similarly high as those of Ca and Mg with $R^2(\text{Al, PLSR}) = 0.79$, $R^2(\text{Al, Lasso}) = 0.74$ and $R^2(\text{Al, GPR}) = 0.81$ (Fig. 6).

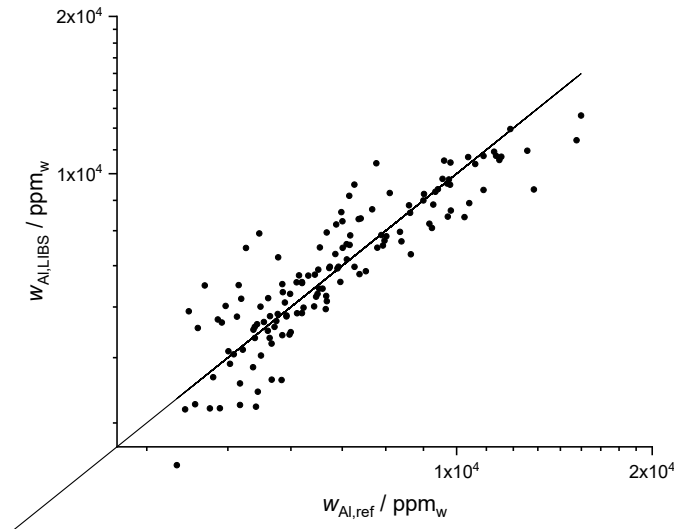


Figure 6. Results of 10-fold GPR cross validation for Al with $R^2(\text{Al, GPR}) = 0.81$.

2.6. Plant available (pa) phosphorus

In addition to the total mass fractions of nutrients, the mass fractions of nutrients potentially available to plants are especially interesting for farmers. Such a prediction should not be possible on the basis of a univariate calibration and can only be based on a multivariate regression, which includes correlations to other elements. As an example, the plant available mass fraction of P was investigated in this work. The best correlation was obtained by GPR with $R^2(\text{P}_{pa}, \text{GPR}) = 0.35$ (Fig. S1 in Suppl. Mat.), which is a first proof-of-principle for predicting plant available nutrient contents based on LIBS. Lasso, with $R^2(\text{P}_{pa}, \text{Lasso}) = 0.25$, and PLSR, with $R^2(\text{P}_{pa}, \text{PLSR}) = 0.22$, yielded slightly worse predictions. It is notable that the prediction of P available for plants was better than the prediction of the total P content.

2.7. Humus and pH

Finally, two important soil parameters, which are also interesting for farmers, are the humus content and the pH value. In Germany, humus denotes the total dead organic substance of the soil. The humus content can be estimated from the content of soil organic carbon by the simple equation $\text{humus} = 1.72 \times C_{\text{org}}$. Since this work is focused on precision agriculture, sample pretreatment for removal of inorganic carbonates in the samples analyzed with LIBS was not carried out. Therefore, a direct univariate calibration based on carbon lines can lead to erroneous results. However, multivariate calibration can consider the inorganic content by correlations with other elements e.g. Ca or Mg. Multivariate regression of the Wilmersdorf samples yielded a good correlation (Fig. 7a). The best prediction of

humus was obtained by Lasso with $R^2(\text{humus, Lasso}) = 0.66$, followed by PLSR with $R^2(\text{humus, PLSR}) = 0.56$ and GPR with $R^2(\text{humus, GPR}) = 0.54$.

Soil pH is a measure for the proton activity in the soil solution. It is influenced by natural buffering due to clay minerals and organic matter. The pH value was measured in a soil suspension in a pH neutral buffer solution of CaCl_2 with a pH meter. Similar to the measurement of the plant available phosphorus and the humus content, pH does not depend on a single element and cannot be determined by a univariate calibration. However, multivariate calibrations yielded successful predictions (Fig. 7b) with $R^2(\text{pH, GPR}) = 0.95$ for GPR, $R^2(\text{pH, Lasso}) = 0.92$ for Lasso and $R^2(\text{pH, PLSR}) = 0.91$ for PLSR.

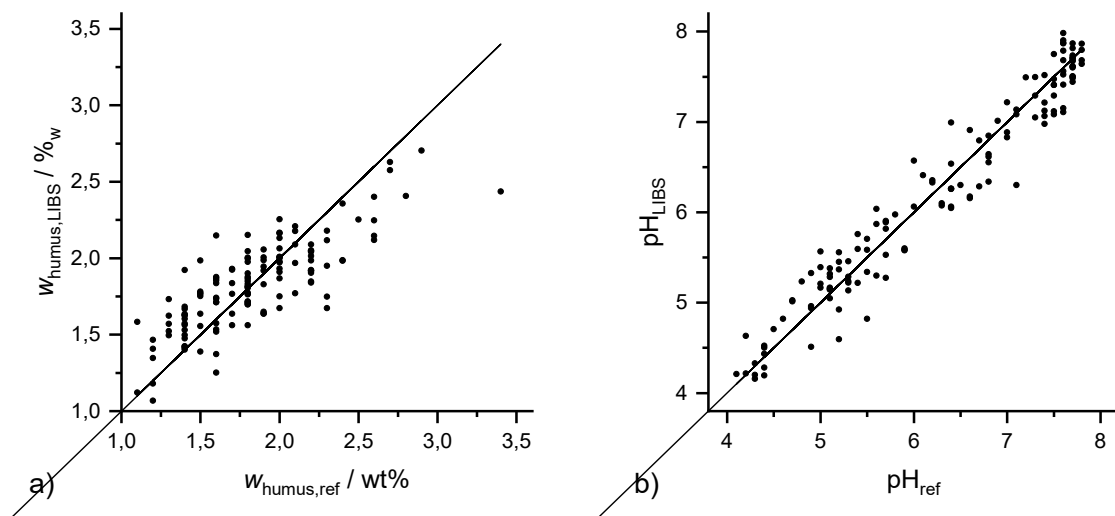


Figure 7. (a) Results of 10-fold Lasso cross validation for humus with $R^2(\text{humus, Lasso}) = 0.66$ and (b) 10-fold GPR cross validation for pH value with $R^2(\text{pH, GPR}) = 0.95$.

2.8. Interpretation of Lasso coefficients

Lasso enables the simplest, most direct interpretation of the three multivariate regression methods. Due to the strong tendency to shrink the regression coefficients of most of the predictor variables to zero, only predictor variables showing a good correlation with the dependent variable are included in the model. Non-zero coefficients indicate which emission lines were relevant for the regression. This is especially interesting for indirect correlations such as the prediction of plant available phosphorus.

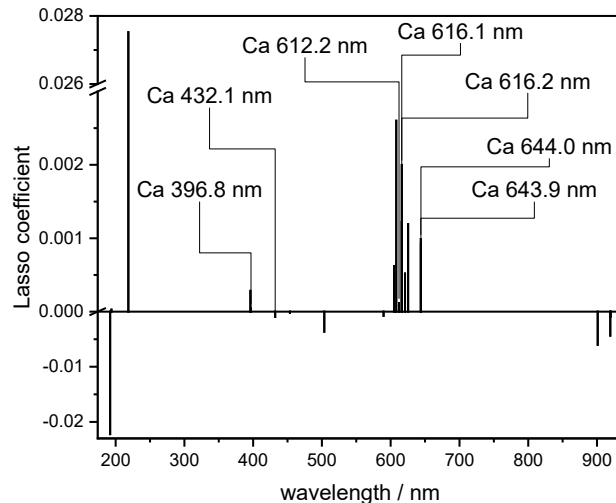


Figure 8. Lasso coefficients for Ca regression.

An example of coefficients obtained by Lasso for Ca is shown in Fig. 8. The assignment of Lasso coefficients to the corresponding lines in the spectrum indicates that seven of fifteen coefficients are caused by Ca lines. If negatively correlated coefficients are neglected, the most positively correlated coefficients are matching the Ca lines. In the Lasso prediction models for N and P, the coefficients did not match the lines due to their low intensities. An inspection of the coefficients yields positive correlations to C lines, which can be explained by the fact that C and N are constituents of humus. Whereas in the case of humus, coefficients that can be assigned to C lines were found, in the case of pH, regression coefficients are found that can be assigned to different alkaline and alkaline earth elements (Na, K, Ca), which influence the pH value.

2.9. Comparison of PLS, Lasso and GPR

The coefficients of determination of the three multivariate methods are summarized in Tab. 2. While PLSR was selected as a standard method, which is very often used in LIBS, and more generally in spectroscopy literature, Lasso is also a robust method and allows a simple interpretation of regression coefficients (spectral lines). However, GPR is an interesting and more seldom applied non-parametric multivariate method in LIBS. As already discussed above, the coefficients of determination of multivariate methods depend on element concentrations, concentration ranges, line numbers and strengths, and matrix effects. Therefore, the best results were obtained for Ca, Mg, Fe and Al (higher concentration, number of lines and line strengths). The worst result was observed for P (low mass fraction, fewer and weak lines). The deviation in the coefficients of determination between the three methods is relatively small for larger coefficients (> 0.5). For smaller coefficients (< 0.5), larger deviations between the methods are observed. GPR yields the best results for six soil parameters, and Lasso yields the best results for three soil parameters. Lasso and GPR are especially more stable in the case of soil parameters which are difficult to predict. This applies to N, Mn and humus in the case of Lasso and the total and plant available P content in the case of GPR. In these cases, two properties of the two regression methods can be of importance, the robust selection of features in Lasso and the non-parametric regression in GPR.

Table 2. Comparison of coefficients of determination of PLSR, Lasso and GPR methods, number of Lasso coefficients (Min/1SE) in parenthesis.

Soil parameter	PLSR	Lasso (Min/1SE)	GPR
Ca	0.87	0.85/0.83 (56/31)	0.89
Mg	0.79	0.75/0.69 (27/16)	0.78
K	0.64	0.65/0.59 (51/16)	0.66
N	0.51	0.65/0.60 (34/10)	0.51
P	0.14	0.21/0.18 (18/8)	0.28
Fe	0.77	0.76/0.71 (52/27)	0.72
Mn	0.21	0.55/0.51 (51/29)	0.13
Al	0.79	0.74/0.72 (76/36)	0.81
P (pa)	0.22	0.25/0.11 (57/10)	0.35
Humus	0.56	0.66/0.58 (47/10)	0.54
pH	0.91	0.92/0.91 (36/32)	0.95

Below, an investigation of several methods of data pretreatment with the aim of obtaining the best results with the multivariate methods and of finding a method of data treatment optimized for the application of handheld LIBS instrumentation in precision agriculture is reported.

2.10. Variance reduction

Požizka et al. [43] investigated a method of variance reduction prior to multivariate classification, which is based on the Euclidean distance of a data point to the center of the coordinate space constructed by the first three principal components. Though this method did not yield the best results in the work cited, it is an interesting approach, which we also applied in the multivariate regression analysis. In this approach, the coefficients of determination of PLSR were compared in order to assess the effect of a removal of 5 %, 20 % and 50 % of the spectra with the largest distance to the center of gravity in PCA. Subsequent to the removal of these spectra, all remaining spectra of one data point are averaged. The results obtained with the modified averaged spectra are compared to those containing the averages of all spectra. In contrast to the data pretreatment applied to all calculations shown above, the spectra were not background corrected and normalized before they were averaged. The results are shown in Tab. 3. The trends for the different elements are not uniform. Averages of the coefficients of determination in the columns of Tab. 3 are a measure for the general trend. Averaging after removal of 5 % of the spectra yields the best results (largest average). However, the difference to averaging without removal of data is small. After further removal of spectra (20 %, 50 %), the coefficients of determination decrease. Although this was observed for most elements, a few elements (e.g. P) show an increase. The reason for the small decrease of the coefficients of determination is not clear. It could be simply a statistical effect related to a decreasing sample size. Despite these results, the application of this method of variance reduction could be useful, especially for difficult multivariate regression problems.

Table 3. Effect of outlier elimination based on the Euclidean distance of a data point to the center of the principal component space, comparison of coefficients of determination for PLSR.

Soil parameter	All spectra	5 % removal	20 % removal	50 % removal
Ca	0.71	0.66	0.51	0.52
Mg	0.73	0.73	0.73	0.72
K	0.60	0.60	0.60	0.54
N	0.48	0.47	0.48	0.43
P	0.18	0.24	0.28	0.22
Fe	0.69	0.70	0.68	0.66
Mn	0.15	0.14	0.15	0.13
Al	0.72	0.73	0.72	0.69
P (pa)	0.25	0.27	0.30	0.24
Humus	0.58	0.63	0.55	0.58
pH	0.86	0.85	0.85	0.83
mean	0.54	0.55	0.53	0.51

2.11. Data pretreatment: background-correction and SNV-normalization

Standard data pretreatment of real-world LIBS spectra currently consists of background correction and averaging in most cases, and normalization in many. In this work, the influence of background correction and normalization on the performance of the three multivariate methods was evaluated in relation to the averaged raw spectra. SNV was the normalization method used. The results are shown in Tab. 4.

Table 4. Effect of background correction and normalization of spectra on multivariate methods, reported as coefficients of determination, in the case of Ca, values in parentheses show the effect of using the logarithms of the mass fractions.

Element	Averaged raw spectra			Background corrected, normalized and averaged spectra		
	PLSR	Lasso	GPR	PLSR	Lasso	GPR
Ca	0.82 (0.68)	0.84 (0.59)	0.86 (0.82)	0.86 (0.87)	0.84 (0.85)	0.83 (0.89)
Mg	0.73	0.71	0.75	0.79	0.75	0.78
K	0.60	0.64	0.60	0.64	0.65	0.66
N	0.48	0.56	0.41	0.51	0.65	0.51
P	0.18	0.16	0.26	0.14	0.21	0.28
Fe	0.69	0.63	0.64	0.77	0.76	0.72
Mn	0.15	0.07	0.01	0.21	0.55	0.13
Al	0.72	0.65	0.71	0.79	0.74	0.81
P (pa)	0.25	0.09	0.37	0.22	0.25	0.35
Humus	0.58	0.41	0.50	0.56	0.66	0.54
pH	0.86	0.77	0.93	0.91	0.92	0.95
mean	0.52	0.47	0.52	0.55	0.61	0.57
change				6 %	31 %	11 %

Background correction and normalization improve the coefficients of determination of the multivariate regressions of the logarithmic and non-logarithmic Ca mass fractions. Especially the coefficients of determination of the regression with logarithmic mass fractions are improved. These are higher than the coefficients obtained by regression of non-logarithmic mass fractions. This is due

to the better consideration of smaller mass fractions in the logarithmic regression, which do not significantly contribute to the non-logarithmic regression.

The coefficients of determination are increased for most elements (soil parameters) after applying background correction and normalization. The coefficients of determination of the different regression methods were averaged for all elements (soil parameters) in order to obtain better and more general trends and the relative increase was calculated. The enhancement is different for the three multivariate methods. Only a small increase of 6 % was obtained for PLSR. The enhancement for GPR is 11 % and the largest increase of 31 % was observed for Lasso. The relatively small increase for PLSR (most common method) could explain why normalization is not applied more often in LIBS studies.

2.12 Data-reduction

The amount of data collected in a measurement campaign of precision agriculture on a field is huge. Therefore, data reduction is an important topic. The approach chosen in this work is based on the integration of lines upon background correction. A threshold in the integration module based on the signal-to-noise ratio determines the number of lines considered and thus the extent of the data reduction. While a high threshold can decrease the number of lines to the most intense lines, a low threshold can include the noise of the baseline. In this work, five different thresholds were selected, which consider both extreme cases and three levels in between. While a plain text file which includes spectra of 137 data points has a size of 17,745 kB, the file after processing with the highest threshold has a size of only 35 kB.

Table 5. Effect of data reduction for different signal-to-noise ratios (SNR) on coefficients of determination obtained for the Ca mass fraction for the three multivariate methods PLSR, Lasso and GPR, application to 137 spectra (samples).

Method	raw	Background corrected	SNR 1	SNR 3	SNR 5	SNR 10	SNR 22
File size / kB	17745	7601	254	137	95	61	35
Data points / spectrum	7701	7701	238	179	149	115	81
R ² (PLSR)	0.82	0.80	0.73	0.76	0.76	0.76	0.70
R ² (Lasso)	0.84	0.80	0.79	0.80	0.82	0.74	0.64
R ² (GPR)	0.86	0.85	0.79	0.73	0.75	0.83	0.76

The results of these investigations are summarized in Tab. 5 and refer to the mass fraction of Ca. All three methods produce similar results and GPR achieves the best performance followed by PLSR and Lasso. The strongest decrease of the performance of the multivariate methods is observed for the transition from raw or background corrected spectra to integrated spectra with the lowest signal-to-noise ratio (SNR). A plateau is reached for the subsequent SNR values and the coefficients of determination for the highest SNR value are much smaller. All multivariate methods show this behavior. It is remarkable that the performance remains nearly constant up to a SNR of 10, which corresponds to 115 data points per spectrum. Therefore, only a small loss of information occurs with increasing data reduction. This means that most of the information in the spectra is concentrated in the peaks clearly visible. On the other hand, the information found in the weak signals is required for maximum performance of the multivariate regression methods. For an assessment of the

computational efficiency, all processes have to be carefully evaluated, which was beyond the scope of this work. A practical scenario could be the online implementation of the data reduction during the measurement campaign on board of the sensor platform, while the evaluation of the data could be performed offline at a later stage. This would result in a manageable amount of data and enable maximum flexibility in the choice of multivariate methods applied later.

4. Conclusion

A commercially available handheld LIBS spectrometer was used for a spatially resolved determination of nutrients and various soil parameters in two agricultural fields. Measurements were conducted in the laboratory. Univariate calibration methods do not usually allow the transfer of a calibration method obtained for one field to a second field. Multivariate methods, however, often better account for matrix effects and have the potential for creating more generalized calibration models. Three different multivariate regression methods (PLSR, Lasso, GPR) were characterized and compared for measuring soil parameters. Lasso and GPR yielded better regression results than PLSR. The focus of this work was the determination of several major and minor nutrients. While several nutrients, such as Ca, Mg, K and Fe, could be determined with good accuracy. Other nutrients, such as Mn and P, could only be determined qualitatively with the handheld instrument. The performance of the multivariate regression models depended on several factors such as the element concentration, the concentration range, the number of lines, the line strengths, and matrix effects. In addition to the mass fractions of nutrients in their elemental form, additional soil parameters were investigated. These include the plant available P content, the humus content and the soil pH. Several methods of data pretreatment, namely variance reduction, background correction and normalization, were tested. The latter method in particular has the potential of yielding improved multivariate regression results. Data reduction of the huge amounts of data generated during a measurement campaign can be performed without a significant loss of information in the multivariate regression.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Comparison of RMSEP of PLSR, Lasso and GPR methods

Author Contributions: conceptualization, D.R., T.B, H.-G.L. and R.G.; methodology, A.E, D.R. and T.B.; formal analysis, T.B.; investigation, A.E, D.R. and T.B.; resources, H.-G.L. and R.G.; data curation, A.E and T.B.; writing—original draft preparation, D.R. and T.B.; writing—review and editing, A.E., H.-G.L. and R.G.; visualization, A.E, D.R. and T.B.; supervision, H.-G.L. project administration, D.R., T.B, H.-G.L. and R.G.; funding acquisition, D.R., T.B, H.-G.L. and R.G.

Funding: The authors gratefully acknowledge the financial support for this research received from the German Ministry of Education and Research (BMBF) in the framework of the BonaRes project Integrated System for Site-Specific Soil Fertility Management (I4S, grant no. 031B0513H).

Acknowledgement: We acknowledge the support of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Potsdam.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Stafford, J. V. Remote, non-contact and in-situ measurement of soil moisture content: a review. *J. Agric. Eng. Res.* **1988**, *41*, 151–172.
2. Gebbers, R.; Lück, E.; Dabas, M.; Domsch, H. Comparison of instruments for geoelectrical soil mapping at the field scale. *Near Surf. Geophys.* **2009**, *7*, 179–190.
3. Heggemann, T.; Welp, G.; Amelung, W.; Angst, G.; Franz, S.O.; Koszinski, S.; Schmidt, K.; Pätzold, S. Proximal gamma-ray spectrometry for site-independent in situ prediction of soil texture on ten heterogeneous fields in Germany using support vector machines. *Soil Tillage Res.* **2017**, *168*, 99–109.
4. Adamchuk, V.I.; Morgan, M.T.; Ess, D.R. An automated sampling system for measuring soil pH. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* **1999**, *42*, 885–891.
5. Zorov, N.B.; Popov, A.M.; Zaytsev, S.M.; Labutin, T.A. Qualitative and quantitative analysis of environmental samples by laser-induced breakdown spectrometry. *Russ. Chem. Rev.* **2015**, *84*, 1021–1050.
6. Fortes, F.J.; Moros, J.; Lucena, P.; Cabalín, L.M.; Laserna, J.J. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 640–669.
7. Hahn, D.W.; Omenetto, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66*, 347–419.
8. Hahn, D.W.; Omenetto, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part I: Review of Basic Diagnostics and Plasma–Particle Interactions: Still-Challenging Issues within the Analytical Plasma Community. *Appl. Spectrosc.* **2010**, *64*, 335A–336A.
9. Cremers, D.A.; Chinni, R.C. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy—Capabilities and Limitations. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2009**, *44*, 457–506.
10. Büchele, D.; Chao, M.; Ostermann, M.; Leenen, M.; Bald, I. Multivariate chemometrics as a key tool for prediction of K and Fe in a diverse German agricultural soil-set using EDXRF. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17588.
11. Zaytsev, S.M.; Krylov, I.N.; Popov, A.M.; Zorov, N.B.; Labutin, T.A. Accuracy enhancement of a multivariate calibration for lead determination in soils by laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2018**, *140*, 65–72.
12. Popov, A.M.; Zaytsev, S.M.; Seliverstova, I. V.; Zakuskin, A.S.; Labutin, T.A. Matrix effects on laser-induced plasma parameters for soils and ores. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2018**, *148*, 205–210.
13. Hastie, T.; Tibshirani, R.; Tibshirani, J.F. *The elements of statistical learning. Data mining, inference and prediction.*; 2nd editio.; Springer: New York, 2009; ISBN 978-1-4614-7137-0.
14. Hastie, T.; Tibshirani, R.; Wainwright, M. *Statistical learning with Sparsity: The Lasso and generalizations*; CRC Press, 2015; ISBN 1498712169.
15. Brickley, R.S.; Brown, D.J.; Turk, P.J.; Clegg, S.M. Improved intact soil-core carbon determination applying regression shrinkage and variable selection techniques to complete spectrum laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Appl. Spectrosc.* **2013**, *67*, 1185–1199.
16. Dyar, M.D.; Carmosino, M.L.; Breves, E.A.; Ozanne, M.V.; Clegg, S.M.; Wiens, R.C. Comparison of partial least squares and lasso regression techniques as applied to laser-induced breakdown spectroscopy of geological samples. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2012**, *70*, 51–67.
17. Boucher, T.F.; Ozanne, M. V.; Carmosino, M.L.; Dyar, M.D.; Mahadevan, S.; Breves, E.A.; Lepore, K.H.; Clegg, S.M. A study of machine learning regression methods for major elemental analysis of rocks using laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2015**, *107*, 1–10.
18. C.E. Rasmussen, C.K.I.W. *Gaussian Processes for Machine Learning.*; MIT Press: Cambridge, Massachusetts, 2006; ISBN 026218253X.
19. Brickley, R.S.; Brown, D.J.; Turk, P.J.; Clegg, S. Comparing VIS–NIRS, LIBS, and combined VIS–NIRS–

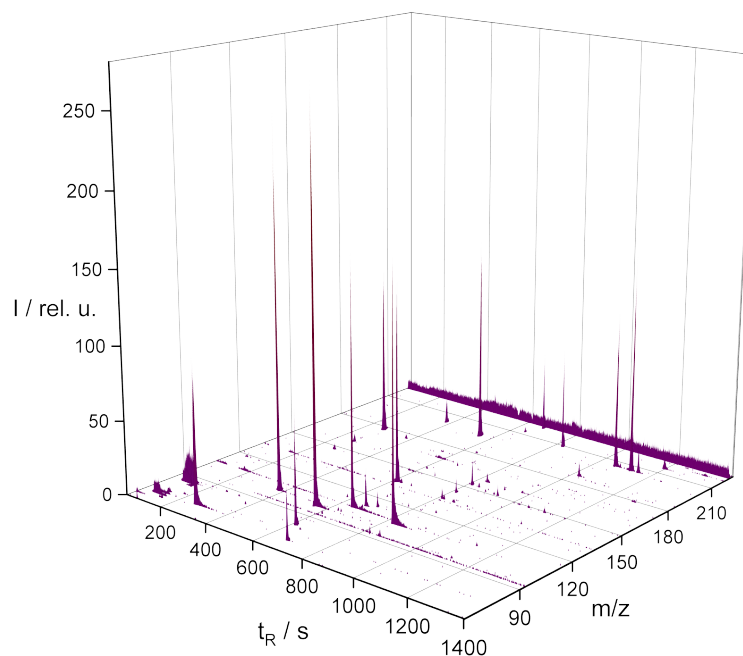
- LIBS for intact soil core soil carbon measurement. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2018**, *82*, 1482–1496.
20. Riebe; Erler; Brinkmann; Beitz; Löhmannsröben; Gebbers Comparison of Calibration Approaches in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Proximal Soil Sensing in Precision Agriculture. *Sensors* **2019**, *19*, 5244.
 21. Guo, G.; Niu, G.; Shi, Q.; Lin, Q.; Tian, D.; Duan, Y. Multi-element quantitative analysis of soils by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) coupled with univariate and multivariate regression methods. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 3006–3013.
 22. He, Y.; Liu, X.; Lv, Y.; Liu, F.; Peng, J.; Shen, T.; Zhao, Y.; Tang, Y.; Luo, S. Quantitative Analysis of Nutrient Elements in Soil Using Single and Double-Pulse Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Sensors* **2018**, *18*, 1526.
 23. Pareja, J.; López, S.; Jaramillo, D.; Hahn, D.W.; Molina, A. Laser ablation–laser induced breakdown spectroscopy for the measurement of total elemental concentration in soils. *Appl. Opt.* **2013**, *52*, 2470.
 24. Díaz, D.; Hahn, D.W.; Molina, A. Evaluation of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) as a Measurement Technique for Evaluation of Total Elemental Concentration in Soils. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66*, 99–106.
 25. Ferreira, E.C.; Milori, D.M.B.P.; Ferreira, E.J.; dos Santos, L.M.; Martin-Neto, L.; Nogueira, A.R. de A. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for multielemental determination in soils under sewage sludge application. *Talanta* **2011**, *85*, 435–440.
 26. Segnini, A.; Xavier, A.A.P.; Otaviani-Junior, P.L.; Ferreira, E.C.; Watanabe, A.M.; Sperança, M.A.; Nicolodelli, G.; Villas-Boas, P.R.; Oliveira, P.P.A.; Milori, D.M.B.P. Physical and Chemical Matrix Effects in Soil Carbon Quantification Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Am. J. Anal. Chem.* **2014**, *5*, 722–729.
 27. Ebinger, M.H.; Norfleet, M.L.; Breshears, D.D.; Cremers, D.A.; Ferris, M.J.; Unkefer, P.J.; Lamb, M.S.; Goddard, K.L.; Meyer, C.W. Extending the Applicability of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Total Soil Carbon Measurement. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2003**, *67*, 1616.
 28. Martin, M.Z.; Wulschleger, S.D.; Garten, C.T.; Palumbo, A. V. Laser-induced breakdown spectroscopy for the environmental determination of total carbon and nitrogen in soils. *Appl. Opt.* **2003**, *42*, 2072.
 29. Martin, M.Z.; Labbé, N.; André, N.; Harris, R.; Ebinger, M.; Wulschleger, S.D.; Vass, A.A. High resolution applications of laser-induced breakdown spectroscopy for environmental and forensic applications. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2007**, *62*, 1426–1432.
 30. Martin, M.Z.; Labbé, N.; André, N.; Wulschleger, S.D.; Harris, R.D.; Ebinger, M.H. Novel Multivariate Analysis for Soil Carbon Measurements Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2010**, *74*, 87.
 31. Martin, M.Z.; Mayes, M.A.; Heal, K.R.; Brice, D.J.; Wulschleger, S.D. Investigation of laser-induced breakdown spectroscopy and multivariate analysis for differentiating inorganic and organic C in a variety of soils. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2013**, *87*, 100–107.
 32. Brickley, R.S.; Brown, D.J.; Barefield, J.E.; Clegg, S.M. Intact Soil Core Total, Inorganic, and Organic Carbon Measurement Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2011**, *75*, 1006.
 33. Ferreira, E.C.; Gomes Neto, J.A.; Milori, D.M.B.P.; Ferreira, E.J.; Anzano, J.M. Laser-induced breakdown spectroscopy: Extending its application to soil pH measurements. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2015**, *110*, 96–99.
 34. Wainner, R.T.; Harmon, R.S.; Miziolek, A.W.; McNesby, K.L.; French, P.D. Analysis of environmental lead contamination: comparison of LIBS field and laboratory instruments. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2001**, *56*, 777–793.
 35. Harmon, R.S.; De Lucia, F.C.; Miziolek, A.W.; McNesby, K.L.; Walters, R.A.; French, P.D. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) – an emerging field-portable sensor technology for real-time, *in-situ* geochemical and environmental analysis. *Geochemistry Explor. Environ. Anal.* **2005**, *5*, 21–28.

36. Harmon, R.S.; Hark, R.R.; Throckmorton, C.S.; Rankey, E.C.; Wise, M.A.; Somers, A.M.; Collins, L.M. Geochemical Fingerprinting by Handheld Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Geostand. Geoanalytical Res.* **2017**, *41*, 563–584.
37. Bennett, B.N.; Martin, M.Z.; Leonard, D.N.; Garlea, E. Calibration curves for commercial copper and aluminum alloys using handheld laser-induced breakdown spectroscopy. *Appl. Phys. B* **2018**, *124*, 42.
38. Senesi, G.S.; Manzari, P.; Consiglio, A.; De Pascale, O. Identification and classification of meteorites using a handheld LIBS instrument coupled with a fuzzy logic-based method. *J. Anal. At. Spectrom.* **2018**, *33*, 1664–1675.
39. Senesi, G.S.; Manzari, P.; Tempesta, G.; Agrosi, G.; Touchnt, A.A.; Ibhi, A.; De Pascale, O. Handheld Laser Induced Breakdown Spectroscopy Instrumentation Applied to the Rapid Discrimination between Iron Meteorites and Meteor-Wrongs. *Geostand. Geoanalytical Res.* **2018**, *42*, 607–614.
40. Crocombe, R.A. Portable Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2018**, *72*, 1701–1751.
41. Rakovský, J.; Čermák, P.; Musset, O.; Veis, P. A review of the development of portable laser induced breakdown spectroscopy and its applications. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2014**, *101*, 269–287.
42. Schirrmann, M.; Gebbers, R.; Kramer, E. Performance of Automated Near-Infrared Reflectance Spectrometry for Continuous in Situ Mapping of Soil Fertility at Field Scale. *Vadose Zo. J.* **2013**, *12*, 1.
43. Pořízka, P.; Klus, J.; Prochazka, D.; Képeš, E.; Hrdlička, A.; Novotný, J.; Novotný, K.; Kaiser, J. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy coupled with chemometrics for the analysis of steel: The issue of spectral outliers filtering. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2016**, *123*, 114–120.
44. Conrad, T.O.F.; Leichtle, A.; Hagehülsmann, A.; Diederichs, E.; Baumann, S.; Thiery, J.; Schütte, C. Beating the Noise: New Statistical Methods for Detecting Signals in MALDI-TOF Spectra Below Noise Level. In *Computational Life Sciences II. CompLife 2006. Lecture Notes in Computer Science, vol 4216*; R. Berthold M., Glen R.C., F.I., Ed.; 2006; pp. 119–128.
45. Guezenoc, J.; Gallet-Budynek, A.; Bousquet, B. Critical review and advices on spectral-based normalization methods for LIBS quantitative analysis. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2019**, *160*, 105688.
46. Röst, H.L.; Sachsenberg, T.; Aiche, S.; Bielow, C.; Weisser, H.; Aicheler, F.; Andreotti, S.; Ehrlich, H.-C.; Gutenbrunner, P.; Kenar, E.; et al. OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 741–748.
47. Kim, K.-R.; Kim, G.; Kim, J.-Y.; Park, K.; Kim, K.-W. Kriging interpolation method for laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) analysis of Zn in various soils. *J. Anal. At. Spectrom.* **2014**, *29*, 76–84.
48. J. Friedman, T. Hastie, R.T. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J. Stat. Softw.* **2008**, *33*, 1–22.

3.3. Detektion flüchtiger Verbindungen im Gasvolumen über Schimmelpilzen mittels Röntgen-basierter GC-APCI-MS

„Detection of volatile organic compounds in the headspace above mold fungi by GC-soft X-radiation based APCI-MS“

Erler, A.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.;
Grothusheitkamp, D.; Kunz, T.; Methner, F.-J.
J Mass Spectrom. 2018; 53:911-920



Inhalt der Publikation und Beitrag des Autors:

Diese Publikation beschreibt die Detektion von flüchtigen organischen Verbindungen, die durch Schimmelpilze freigesetzt werden. Die Pilze, welche zu vier verschiedenen Gattungen gehören, wuchsen auf Agar-basierten Nährböden. Die Proben, welche von den Partnern der Technischen Universität Berlin hergestellt wurden, habe ich mittels Festphasenmikroextraktion aus verschlossenen Headspace-Gläsern überführt. Die beschriebenen Messungen wurden von mir an zwei GC-gekoppelten Massenspektrometern durchgeführt. Die in Eigenbau gefertigte Ionisationskammer des APCI-MS wurde mir von Dr. Daniel Riebe zur Verfügung gestellt. Die Auswertung der Messungen, inklusive der Identifikation der gesuchten Substanzen, wurde von mir durchgeführt. Ich war an der Diskussion der Ergebnisse beteiligt und habe die meisten der hier enthaltenen Abbildungen erstellt. Der Schreibprozess fand in enger Zusammenarbeit mit den Koautoren statt.

Detection of volatile organic compounds in the headspace above mold fungi by GC-soft X-radiation based APCI-MS

A. Erler,¹ D. Riebe,¹ T. Beitz,¹ H.-G. Löhmannsröben,¹ D. Grothusheitkamp,² T. Kunz,² F.-J. Methner²

1 University of Potsdam, Physical Chemistry, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam

2 Technische Universität Berlin, FG Brauwesen, Seestr. 13, 13353 Berlin

Abstract

Mold fungi on malting barley grains cause major economic loss in malting and brewery facilities. Possible proxies for their detection are volatile and semivolatile metabolites. Among those substances, characteristic marker compounds have to be identified for a confident detection of mold fungi in varying surroundings. The analytical determination is usually carried out through passive sampling with SPME, gas chromatographic separation and detection by EI-MS, which often does not allow a confident determination due to the absence of molecular ions. An alternative is GC-APCI-MS, generally, allowing the determination of protonated molecular ions. Commercial APCI sources are based on corona discharges, which are often unspecific due to the occurrence of several side reactions and produce complex product ion spectra. To overcome this issue, an APCI source based on soft X-radiation is used here. This source facilitates a more specific ionization by proton transfer reactions only. In the first part, the APCI source is characterized with representative volatile fungus metabolites. Depending on the proton affinity of the metabolites, the limits of detection are up to two orders of magnitude below those of EI-MS. In the second part, the volatile metabolites of the mold fungus species *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* and *Penicillium* are investigated. In total, 86 compounds were found with GC-EI/APCI-MS. The metabolites identified belong to the substance classes of alcohols, aldehydes, ketones, carboxylic acids, esters, substituted aromatic compounds, terpenes and sesquiterpenes. In addition to substances unspecific for the individual fungus species, characteristic patterns of metabolites, allowing their confident discrimination, were found for each of the four fungus species. 67 of the 86 metabolites are detected by X-ray based APCI-MS alone. The discrimination of the fungus species based on these metabolites alone was possible. Therefore, APCI-MS in combination with CID alone could be used as a supervision method for the detection of mold fungi.

Keywords: gas chromatography, mass spectrometry, APCI, mold fungi, soft X-radiation, volatile organic compounds

Introduction

Mold fungi contaminating barley grain cause major economic losses in malting and brewery facilities due to the spoilage of grain and the production of mycotoxins [1]. The infestation can take place on the field or in storage. Examples of field pests include *Fusarium culmorum* and *Fusarium DW19A*, whereas *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum* and *Penicilium* are examples of storage pests. Fungi of the genus *Fusarium* are among the most important grain pathogens. Besides harvest losses, a major issue is the grain contamination with *Fusarium* trichothecene type A mycotoxins (e.g. T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol) and *Fusarium* trichothecene type B mycotoxins (e.g. deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV)). In addition to the non-volatile mycotoxin metabolites, several volatile and semivolatile metabolites are also produced by the fungi. For different *Fusarium* species, 50 volatile and 53 semivolatile substances were found [2–4]. The latter include sesquiterpenes, which serve as infochemicals and building blocks in the biosynthesis of mycotoxins (trichodienes) [5–7]. Another fungus, encountered as field and storage pest alike, is *Alternaria alternata*. *A. alternata* is a plant pathogen, produces mycotoxins and is an important source of allergens [8–10]. While the database of microbial volatile organic compounds (mVOC) only records one substance (6-methoxyheptanol) [11], more than 20 sesquiterpenes were identified for *A. alternata* [12]. *Aspergillus* fungi are responsible for a high number of hospital infections and for food spoilage [13–15]. In a study based on multidimensional chromatography, 428 compounds, including hydrocarbons, alcohols, esters, ketones, aldehydes, could be detected [16]. 44 of the compounds were observed under all conditions. Since conventional laboratory methods for the detection and identification of fungi based on cell cultivation are usually time-consuming, approaches based on the detection of molecules such as MALDI-MS [17] are being developed. One possible way is the search for characteristic volatile marker compounds in the headspace above the fungi. An advantage of the method is the possibility of detecting hidden fungus contaminations, as they occur, e.g., in grain storages. Furthermore, headspace studies contribute to the characterization of the metabolome of the fungi and its dependence on the nutrient medium, the cultivation duration and occurring competition with other fungi or the medium (e.g. barley) itself. The majority of the studies concerned with detecting mVOC in the headspace above microorganisms (e.g. bacteria, fungi) is carried out by active (thermodesorption) or passive (solid phase microextraction, SPME) sampling with subsequent analysis by gas chromatography (GC) and electron ionization (EI) mass spectrometry (MS) [12,16]. The characterization of the substances is carried out via the comparison of retention indexes and fragment ion patterns. The latter is based on the fragmentation of the compounds upon impact of electrons with a kinetic energy of typically 70 eV. The fragment ion spectra can be used for the identification of the substances by database (e.g. NIST) matching. The disadvantage of this ionization method is the absence of a molecular ion peak for many substances, which is the prerequisite for a reliable assignment.

The latter is addressed by atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) [18], the result of which are usually protonated molecular ions. Fragmentation reactions can only be observed for a few substance classes, e.g. alcohols ($[M-OH]^+$). In this regard, EI and APCI are complementary ionization methods. Commercial APCI sources in MS are based on corona discharges. The underlying ionization mechanism is complex and includes the formation of hydrated protons $[(H_2O)_nH]^+$ as reactant ions. These complexes transfer the protons in a secondary reaction to the analyte molecules. Although the corona discharge source is inexpensive, it has some disadvantages. Thus, ionization by additional, competing ionization processes is observed. These processes include the formation of further reactant ions based

on reactive nitrogen oxides or photoionization, which result in a wide variety of analyte ions and therefore impede interpretation of the spectra. Another problem is the limited lifetime of the corona needle due to wear of the tip, which causes a variation of the electric field strength and the associated ionization yield. An alternative could be the application of an APCI source based on soft X-radiation. The underlying ionization mechanism is more selective because it is mainly based on proton transfer from protonated water clusters to the analyte molecules. Also, X-ray sources exhibit high long-term stability. Miniature X-ray sources have already been introduced as alternatives for radioactive ^{63}Ni -sources in ion mobility (IM) spectrometers by the company Bruker Daltonics (Leipzig, Germany). In these instruments, the product spectra obtained by the two ionization methods are not distinguishable. Our group already demonstrated the use of this X-ray source in APCI-MS for the investigation of the ionization mechanisms of explosives [19]. In that paper, a detailed description of the underlying ionization mechanisms can also be found.

In the first part of this work, the X-ray based APCI source is characterized. The second part presents its application for the detection of the mVOC in the headspace above the field pest species *Fusarium* and *Alternaria* as well as the storage pest species *Penicillium* and *Aspergillus*. The fungi were grown on different galactose-polymer based nutrient media: wort agar, barley agar und barley/malt agar. The analysis was carried out via SPME sampling followed by parallel GC-APCI/EI-MS investigations.

Experimental section

Microbiological sample preparation

The investigated samples were produced by inoculating sterilized growth media with spore suspensions of the corresponding fungus. Wort, barley and barley/malt agar were used as growth media. The spore suspensions were produced by suspending the breeding media (including the fungi) in a 0.9 % NaCl solution and subsequent filtration. The agar substrates (6 – 8 ml/vial) were inoculated directly inside the headspace vials (HSV, 20 mL volume). The growth period was typically 8 days at a temperature of 25 °C.

The mold fungus cultures used were obtained from culture collections (Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) or were isolated from contaminated grain samples. The investigated field pests were *Fusarium culmorum* (DSMZ 62191), *Fusarium* sp. (isolate from DON-contaminated diastase wheat) and *Alternaria* sp. (isolate from brewing barley). The investigated storage pests were *Aspergillus niger* (DSMZ 22593), *Aspergillus ficuum* (DSMZ 932/NRRL 3135) and *Penicillium* sp. (isolate from brewing barley).

Headspace characterization

After the growth period, the HSV were hermetically sealed and left for another 48 h in order to stop the fungus growth. Afterwards, sampling was carried out via SPME. The fiber used was coated with divinylbenzene, carboxen and polydimethylsiloxane. The adsorption of volatile compounds was carried out at 45 °C for 1 h. The desorption in the GC injector was performed for 1 min at a temperature of 250 °C.

The separation of the substances on the GC column used the following temperature program: initial period of 5 min at 32 °C, heating period with 10 °C/min, final period at 200 °C for 8 min. The columns in both GC devices used the same composition of the stationary phase (poly(5 % diphenyl-95 % dimethylsiloxane)) but different inner diameters. The GC-EI-MS system (7890A GC System, Agilent

Technologies) used a column of 15 m x 0.25 mm x 1.0 μm , while the GC-APCI-MS system (5890 Series II GC, Hewlett Packard) used a column of 15 m x 0.32 mm x 1.0 μm . While the GC-EI-MS needs a smaller diameter to maintain the vacuum in the MS, a larger diameter in the atmospheric pressure device allowed the injection of a larger substance amount.

The EI-MS measurements were carried out with an Agilent 5975C EI/CI MSD. In order to remove the background signals of the growth medium, difference chromatograms were generated. The remaining peaks were analysed using the MSD ChemStation software by comparing the mass spectra with the integrated NIST database. Only peaks with a database match of at least 65 % were taken into account for further analysis. For the subsequent EI-APCI correlation, the retention times t_R of the GC peaks and the observed or predicted molecular masses of the corresponding substance proposals were recorded. A miniature X-ray source (Fig. 1a) was used instead of the standard APCI source of the ion trap MS (LTQ XL, Thermo Fisher Scientific). The source is located in a self-developed ionization chamber (Fig. 1b) and has been described previously [19]. The source emits soft X-rays with an energy of 2.7/2.8 keV ($L\alpha/L\beta$ -transitions of Rh) and is therefore exempt from registration in Germany. The chamber has several functions: a) sample introduction, b) temperature control in order to reduce memory effects, c) shielding of the reaction area (ionization reactions) against environmental influences, d) shielding of the surroundings against X-rays and e) efficient ion transfer through electrostatic fields.

Two evaluation methods were used. The investigation of single mass traces was carried out with the spectrometer's evaluation software (Xcalibur, Thermo). Additionally, 2D- and 3D-plots were used to get an overview/mapping of the metabolite spectra and to compare different measurements. These plots were created in the OpenMS software [20] after converting the raw data using a custom Python script. Additionally, collision induced dissociation (CID) in MS^2 experiments was carried out in the ion trap MS.

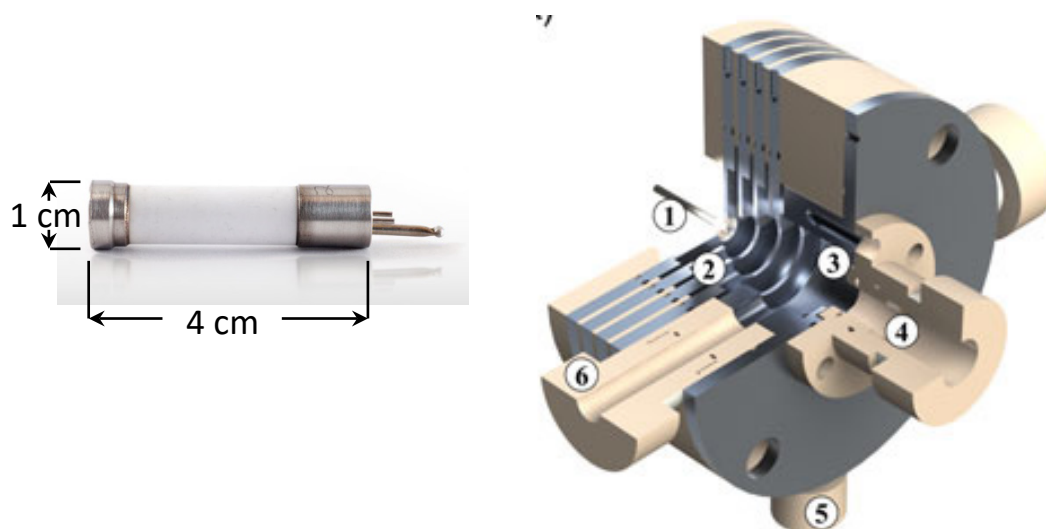


Fig. 1 a) miniature X-ray source; b) CAD-image of the APCI-chamber, 1. MS transfer capillary, 2. focusing electrodes, 3. ionization area, 4. X-ray source fitting, 5. GC transfer capillary fitting, 6. laser windows

In order to correlate the EI- and APCI-MS results, the retention indices (I_R) of the peaks found were calculated. Since alkane mixtures, the generally accepted standard, are not detectable with APCI, the indices were determined in two steps. For this purpose, an mVOC standard mixture containing the following literature-known fungus metabolites was prepared in hexane as solvent: 3-methyl-1-butanol

(a, 2 mM), 2-hexanone (b, 100 μ M), cyclohexanone (c, 3 μ M), α -pinene (d, 200 μ M), benzaldehyde (e, 50 μ M), 3-octen-1-ol (f, 50 μ M), 2-phenylethanol (g, 100 μ M), longipinene (h, 20 μ M) and caryophyllene (i, 20 μ M) (Sigma-Aldrich). The retention indices of these substances were measured through GC-EI-MS measurements using an alkane standard as reference. Subsequently, the mVOC-standard indices were used to determine the indices of the substances found in the fungus headspace. Plotting the retention time of the EI and APCI measurements against each other showed a linear behaviour. In the case of an agreement between the molecular ion masses and the retention indices of the peaks observed in EI and APCI, the corresponding substance was considered identified and included in the list of mold fungus mVOC.

Results and discussion

Characterization of the soft X-ray based APCI source in comparison to the EI source

The example of the analysis of mVOC in the headspace above various mold fungi will be used to characterize X-ray based APCI in comparison to EI. To this end, an mVOC standard was chosen which contains typical volatile fungus metabolite representatives of the most important substance classes. The aim of the mVOC standard was twofold. First, the standard should allow the correlation of retention times of APCI-MS and EI-MS and therefore a reliable assignment of the mass spectra obtained by both methods. Secondly, the standard should be used for the quantitative characterization (LOD, response factors) of the different substance classes in both methods.

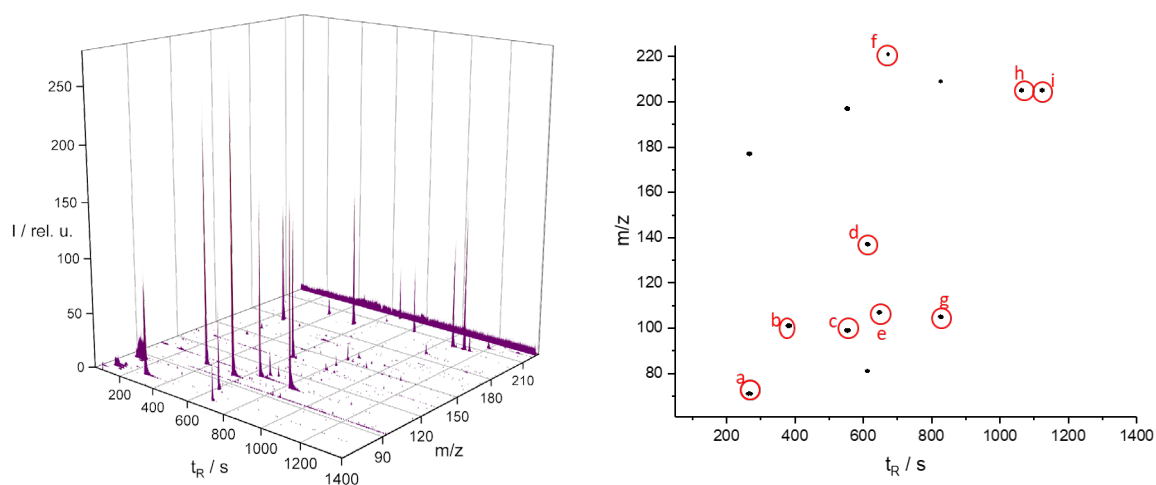


Fig. 2 GC-APCI-MS spectra of the mVOC standard, a) 3D plot and b) 2D plot (refer to exp. part for substance code)

APCI usually produces only one peak per substance in the mass spectrum, which can be assigned to the protonated molecule. Commercial APCI sources based on corona discharge are less specific. Thus, several side reactions, such as photoionization or ion-molecule reactions with reactive nitrogen species, are observed. Especially in close vicinity to the corona needle where the field strength is high, fragmentation reactions are also observed. By contrast, soft X-ray based APCI is very selective, almost exclusively proceeding by protonation of analytes from protonated water clusters. Only a few exceptions, such as the formation of $[M-OH]^+$ upon loss of an OH group for alcohols or the formation of dimer ions $[2M+H]^+$ at higher analytes concentrations, were observed.

Due to the selective formation of $[M+H]^+$, the GC-APCI-MS data can be presented in two- or three-dimensional spectra (in comparison to GC-EI-MS data) (Fig. 2). This also allows the observation of coeluting substances with different masses, which are recorded as individual peaks. Analogous to 2D chromatography, a significant increase of the peak capacity in the two-dimensional space is obtained. In the case of coeluting substances with strong differences in proton affinities (PA), charge competition can reduce the signal intensity of compounds with lower proton affinity or even result in their complete suppression.

Similar to total ion current (TIC) chromatograms in GC-EI-MS (Fig. 3a), selected ion monitoring (SIM) traces in GC-APCI-MS can be extracted and displayed separately (Fig. 3b) or combined to TIC chromatograms. The comparison of the full widths at half maximum of the GC peaks shows that the chromatographic resolution of the commercial system is about 2 to 3 times better. On the one hand, this finding can be attributed to the larger diameter of the GC column of the APCI system (ID = 0.33 (APCI) vs. 0.25 mm (EI)). On the other hand, the volume of the APCI ionization chamber is relatively large, which results in peak broadening. The chamber was not originally designed for a GC application. In principle, a reduction of the volume is possible. However, the reduction was not necessary in regard to the complexity of the headspace samples. Another source of peak broadening is the low recording frequency of the ion trap MS (injection time = 300 ms).

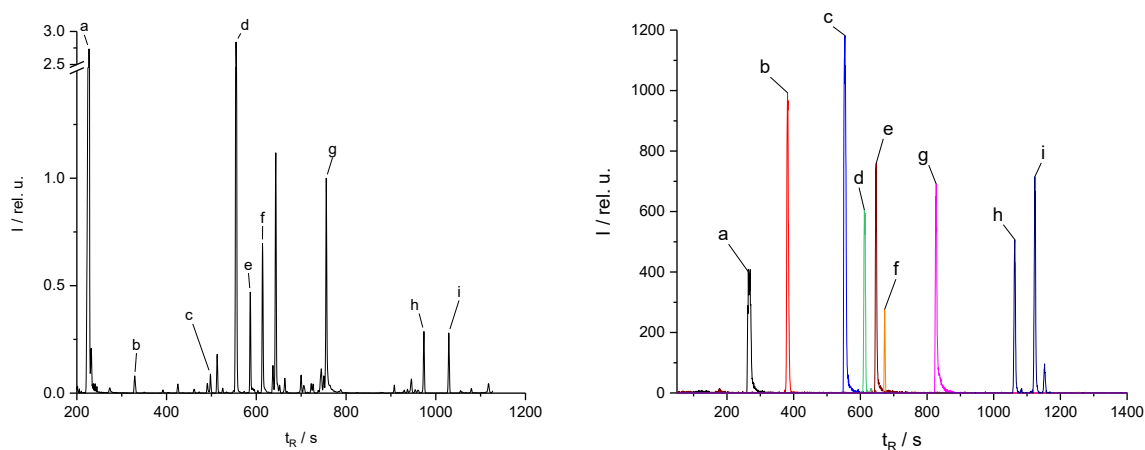


Fig. 3 TIC chromatograms of the mVOC standard obtained by a) GC-EI-MS and b) GC-APCI-MS (refer to exp. part for substance code)

A comparison of the chromatograms obtained with both systems reveals a strong variation of the relative peak intensities (note the concentrations of the components of the standard, see exp. part) which means the response factors f_R vary within each ionization method as well as between both methods strongly. Fig. 4 shows the response factors relative to 2-phenylethanol as an internal reference (logarithmic scale). The response factors exhibit a strong variation of a factor of 300 in the APCI-MS while in the EI-MS, they only vary around a factor of about 40. Since compounds of low PA can only be detected with low sensitivity, or not at all, the reported variation of the response factors in APCI should rather be considered a lower limit.

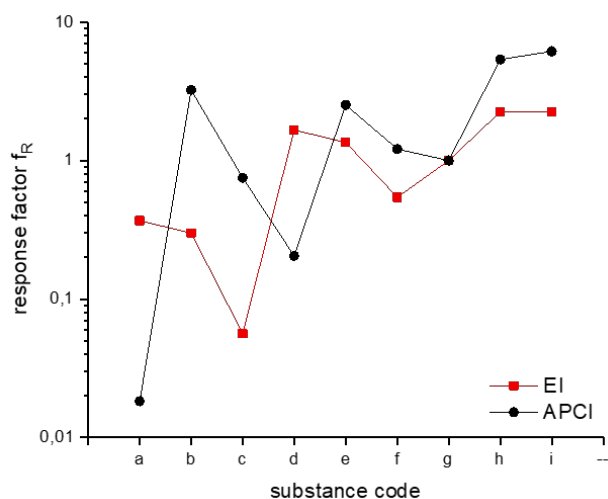


Fig. 4 Response factors of the components of the mVOC standard relative to 2-phenylethanol ($f_R = 1$) after ionization by APCI (black) and EI (red) (refer to exp. Part for substance code)

Although the PA of both sesquiterpenes are not known, due to the lack of heteroatoms (N, O) and isolated double bonds, small response factors similar to the terpenes should be anticipated. However, the observed response factors are among the largest of the mVOC standard, which makes their detection with APCI-MS attractive. The large differences between the response factors in APCI compared to EI also manifest in a stronger variation of the LOD (Fig. 5).

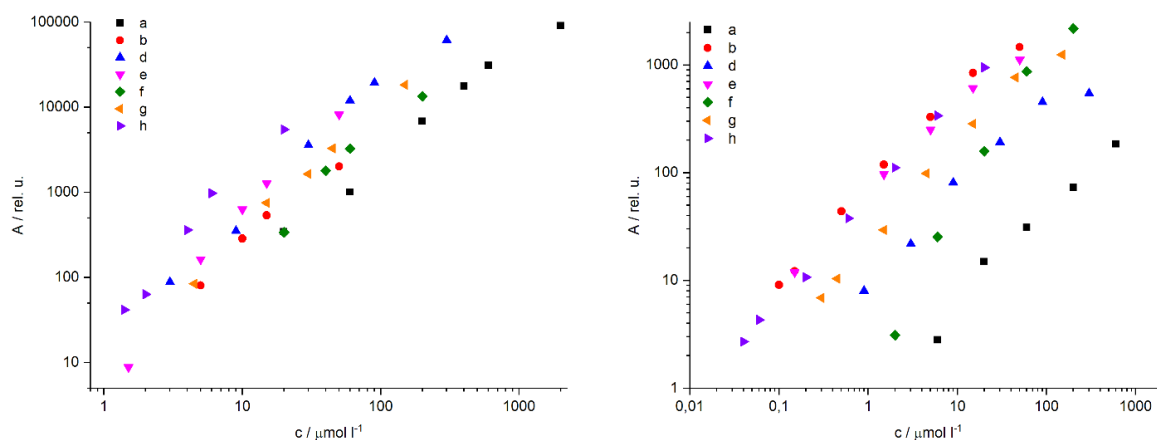


Fig. 5 Calibration curves (peak area A vs. concentration) of the mVOC-standard measured with a) GC-EI-MS and b) GC-APCI-MS

For an evaluation of the sensitivity of the two systems, calibration curves of the mVOC-standard were generated (Fig. 5, log-log plots). The LOD variation is visibly less in the EI-MS (between 1-20 μM) than in the APCI-MS (between 40 nM and 10 μM). An unambiguous correlation between LOD and substance structures cannot be made. With increasing PA, the probability for a proton transfer from protonated water clusters increases. This is observed when comparing the alcohols with the aldehydes or ketones. The significantly lower PA of the alcohols result in higher LOD. However, a correlation of LOD and PA cannot be performed since the PA of most substances are unknown.

In this work, a combination of EI-MS and APCI-MS is used to characterize the mVOC of mold fungi. Structure information is primarily obtained by the EI-MS. However, fragment ion spectra can also be

obtained in APCI-MS by CID in MS² experiments in ion trap or triple quadrupole instruments. These fragment patterns can be used for deriving structure information as well for substance identification. However, in contrast to EI-MS, the available databases are far less comprehensive. CID-MS spectra provide characteristic patterns for individual substances. In the simple case of the ketones and aldehydes of the mVOC standard, characteristic fragments, such as [M+H-H₂O]⁺ for the ketones and [M+H-CO]⁺ for the aldehydes, are obtained. More complex patterns are found for other compounds, e.g. for the sesquiterpene caryophyllene (see Fig. 6).

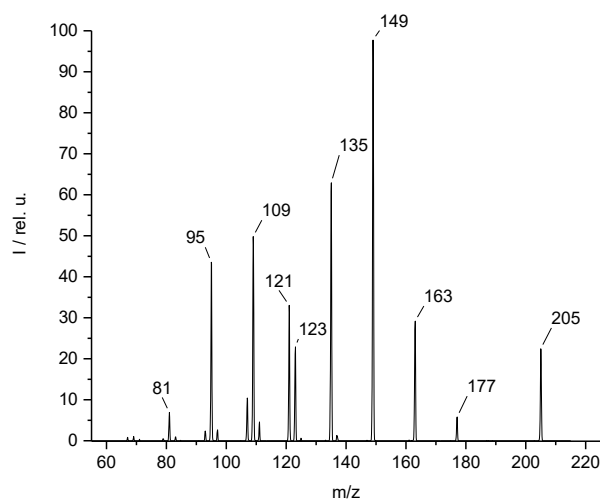


Fig. 6 CID-MS spectrum of caryophyllene

Headspace investigations of fungi on different growth media

GC-EI/APCI-MS investigation of the fungi headspace. The GC-EI-MS TIC chromatogram and GC-APCI-MS 2D plot of the headspace of *Fusarium culmorum* shown in figure 7 is a representative example for the complexity of the data of all fungi investigated. The identification of the mVOC is based on the comparison of the EI fragment pattern with the NIST database, the detection of protonated molecules [M+H]⁺ after APCI, and a comparison of the calculated retention indices with literature values. The information obtained by EI- and APCI-MS independently, i.e. the structure and the molecular mass, was matched by a correlation of retention indices.

The majority of the identified substances in the headspace above *Fusarium culmorum* were detected with both methods. The substances belonged to the following classes: alcohols, aldehydes, ketones, esters, substituted aromatics, terpenes, sesquiterpenes and oxidized forms of the latter two. A number of substances could only be identified by one of the two methods and were classified as unknown. The reasons can include low response factors or high LOD. Additionally, many of these substances occurred only as traces. A potential advantage of the APCI method in addition to the molecular mass information, is the independent detection of coeluting substances with different masses in the 2D spectrum. Two examples of coeluting substances are highlighted in the 2D spectrum on the right of Fig. 7.

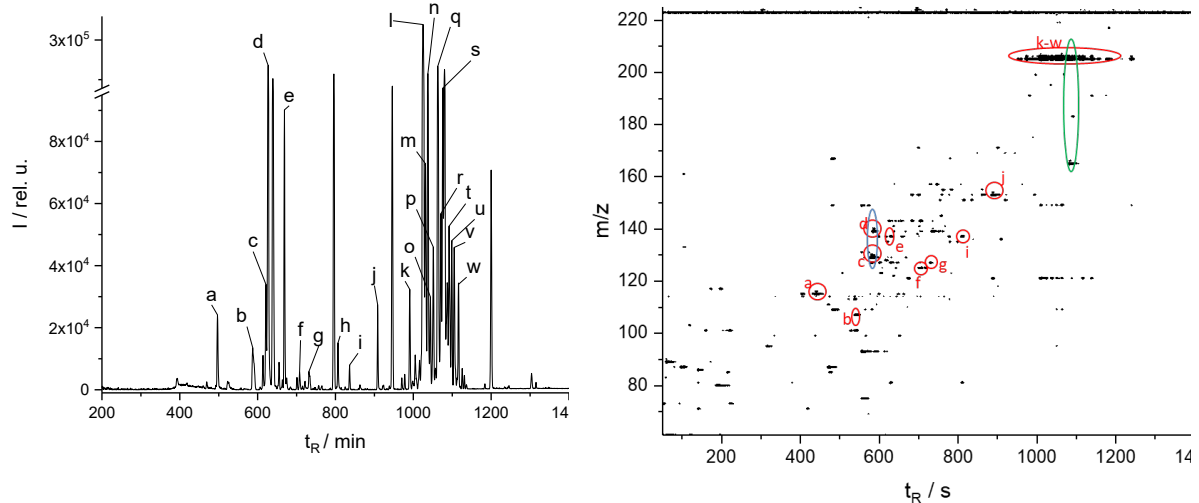


Fig. 7 EI/APCI-MS spectra of the mVOC in the headspace above *Fusarium culmorum*, a) EI-TIC chromatogram and b) APCI 2D spectrum

Figure 8 shows a heatmap of the combined results of the investigation of the mVOC spectrum of the fungi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Alternaria*. The four primary columns represent the different fungi, while the three secondary columns inside each of them contain information on the influence of the growth media (wort, barley, barley/malt agar). The rows contain semiquantitative information on the different metabolites (mVOC) found, ordered by substance class. Due to the varying and often unknown response factors, in this work, the mVOC concentrations were determined only semiquantitatively and classified as major components (red), minor components (blue), and traces (green). A complete list of the detected metabolites can be found in table S1 of the supplementary material.

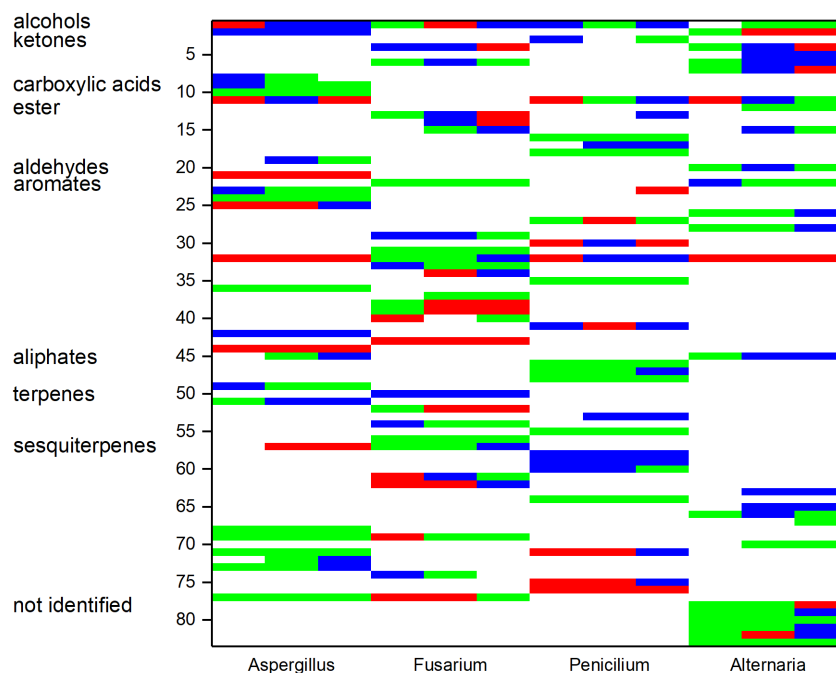


Fig. 8 Heatmap of the mVOC spectra of the four fungus species: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Alternaria*, each on three different growth media (left to right in each column: wort, barley, barley/malt agar) (colors: red – major components, blue – minor components, green – traces)

In total, 86 mVOC were detected. Even at first glance, a comparison of the primary columns representing the individual fungi reveals different patterns. The patterns correspond to different mVOC spectra that can potentially be used for distinguishing the different fungus species. With regard to a particular fungus, mostly the same mVOC are found in the headspaces above all three growth media investigated. Since the information density of the heatmap is rather high, the following discussion will be focussed on two representative sections of the heatmap (Fig. 9).

The first section of the heatmap (Fig. 9, left) contains a comparison of the fungus species (without consideration of the growth media) based on two mVOC classes, the substituted aromatics and the sesquiterpenes. There are relatively few commonalities between the mVOC of the four fungi in the heatmap. Therefore, an identification of the different fungus species based on the spectrum of the sesquiterpenes is potentially possible. The sesquiterpenes produced by the different fungi vary in number and intensity. *Penicillium* and *Aspergillus* produce the highest concentration of sesquiterpenes on the growth media investigated. By contrast, *Fusarium* produces more aromatic compounds than sesquiterpenes. Therefore, analogous to the sesquiterpenes, the spectrum of substituted aromatic compounds could be used for the discrimination of the fungi.

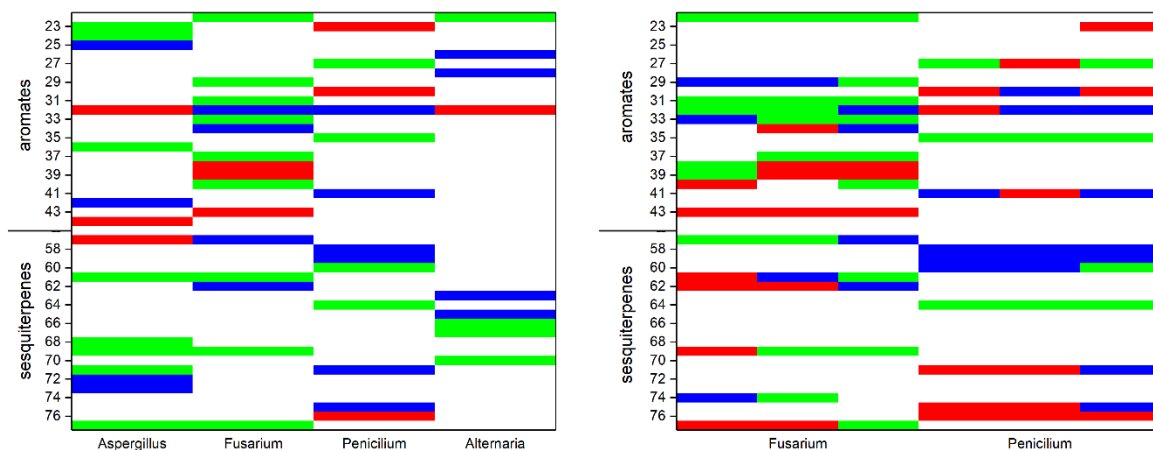


Fig. 9 Representative sections of the heatmap in Fig. 8, a) comparison of the aromatics and sesquiterpenes produced by the different fungus species (without considering growth media), b) growth medium influence on the mVOC emitted by the fungi *Fusarium* and *Penicillium* (left to right in each column: wort, barley/malt, barley agar)

The influence of the growth medium is shown on the right of figure 9 for the fungi *Fusarium* and *Penicillium* as well as the substance classes substituted aromatics and sesquiterpenes. One important insight is that for *Penicillium* nearly all mVOC are detected above each of the growth media. Differences in the concentrations of the different mVOC are a result of the growth kinetics of the fungi on the different substrates. The observations are largely the same for *Fusarium*.

The pronounced differences in the mVOC spectra of the different fungi are also reflected in the frequency distributions of the substances over the substance classes. These frequency distributions are shown as pie charts for the different fungi on barley agar (Fig. 10). In these charts, the colors represent the different substance classes, with solid areas representing higher intensities and patterned areas indicating traces. The pie charts comprise 26 mVOC for *Aspergillus*, 25 mVOC for *Fusarium*, 22 mVOC for *Penicillium* and 25 mVOC for *Alternaria*.

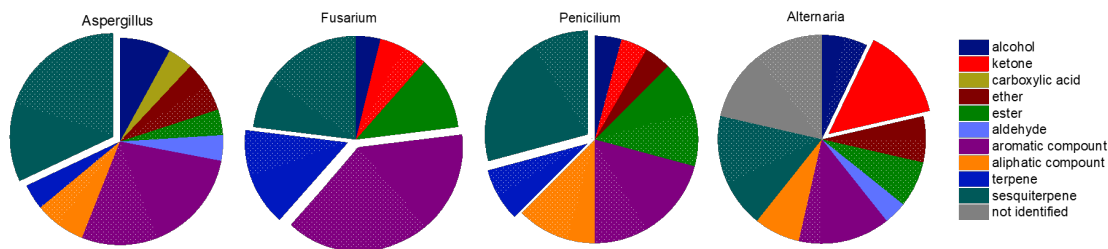


Fig. 10 Pie charts representing the frequency distribution of substance classes for the four types of fungus on barley agar

Similar to the heatmaps, a strong variation in the distribution of individual substance classes is observed for the respective fungus species. The alcohols, esters, aromatic compounds and sesquiterpenes are the substance classes with a relatively stable ratio of the overall spectrum, while some variation is observed for the latter two. Thus, *Fusarium* exhibits the highest ratio of aromatic compounds while *Aspergillus* and *Penicillium* possess the highest ratio of sesquiterpenes. Larger differences are found for the ratios of the ketones, aldehydes and terpenes. The highest ratio of ketones was found in the *Alternaria* headspace. Conversely, no ketones were found in the headspace of *Aspergillus*. Likewise, terpenes were detected for *Penicillium* and *Fusarium* while only traces were found for *Aspergillus* and none for *Alternaria*.

Characterisation of specific and unspecific marker substances

The mVOC patterns in the heatmaps in figures 8 and 9 qualitatively show the potential of the headspace analysis for the differentiation between the fungi on different growth media. The focus of figure 11 is the specific identification of the fungus species. Here, the individual mVOC which are specific in our measurements are assigned to the respective fungus species. They are presented in different rows according to their origin. Additionally, non-specific mVOC are presented which were detected for different fungus species in this work and also those which were already found in the headspace above other fungi as reported in the literature.

The majority of the mVOC detected in this work is specific for one of the investigated fungus species and can therefore be used for their identification. However, any expansion of the investigated spectrum of fungi/microorganisms will yield additional mVOC and also result in an overlap with the marker substances considered specific, here. Taking the mVOC described in the literature (beige in Fig. 11) into account results in a drastic reduction of the number of specific markers. Notwithstanding the significant reduction of the marker substances, specific mVOC are still observed for each of the different fungus species: 12 mVOC for *Aspergillus*, 8 mVOC for *Fusarium*, 11 mVOC for *Penicillium* and 12 mVOC for *Alternaria*.

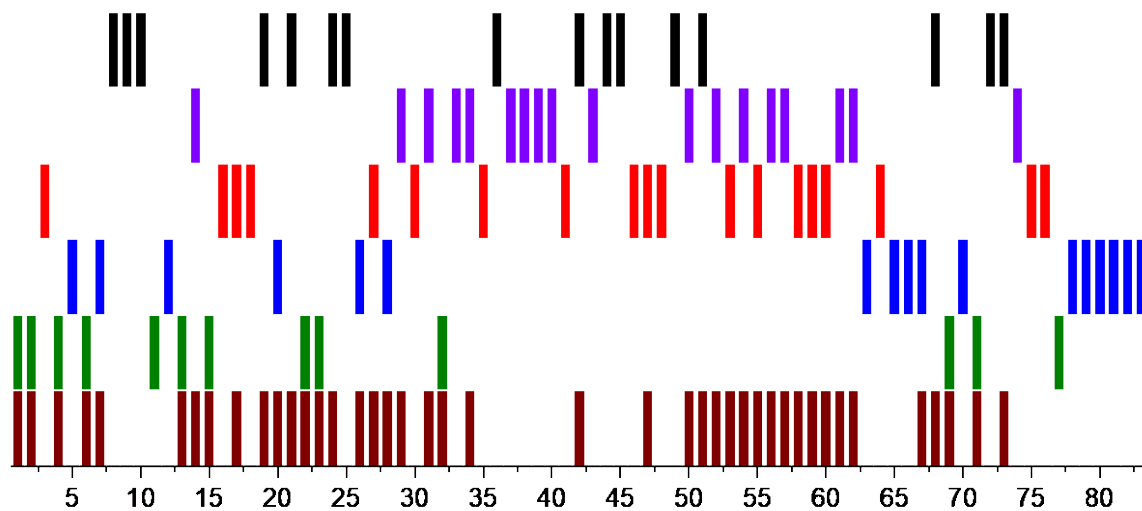


Fig. 11 Assignment of marker substances (refer to table in supplementary material for substance code) found in the headspace to the four fungus genera: *Aspergillus* – black, *Fusarium* – purple, *Penicillium* – red, *Alternaria* – blue, nonspecific mVOC in this work – green and nonspecific mVOC found in the literature – brown

Tab. 1 contains the mVOC presented in figure 11. The nonspecific markers include alcohols, ketones, esters and aromatics as well as a number of sesquiterpenes. While no alcohols are among the specific markers of *Fusarium*, aromatic compounds and sesquiterpenes are predominant. The marker compound spectrum of *Penicillium* is characterized by carboxylate esters, aromatics, terpenes and sesquiterpenes. While the marker substances of *Aspergillus* are distributed evenly among all substance classes, *Alternaria* exhibits the smallest marker substance spectrum.

Tab. 1 specific/nonspecific mVOC (refer to table in supplementary material for substance code)

fungus	marker
Aspergillus	3-Butylcyclohexanone, 2-Methylbutyric acid, 2,7-Dimethyloxepine, Ethylhexadecanoate, 3-Methylbutanaldehyde, 1-Methyl-2-isopropylbenzen, 1-Ethyliden-octahydro-7a-methyl-1H-indene, 7-Methyl-1-naphthole, Butylhydroxytoluen, 2-Butyl-3-hexyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin, Cyclooctatetraene, 2-Methyl-2-bornene, γ -Cadinene, Aristolene, Longifolene
Fusarium	Ethyl-3-methylbutanoate, 3,5-Dimethylanisole, 2-Ethylanisole, 4-Ethylphenol, 3-Ethylphenol, Ethylbenzoylacetate, 3,5-Dimethoxytoluene, 4-Ethyl-2-methoxyphenol, Hydroxyphenylurea, 2,3,5,6-Tetramethyl-p-benzoquinone, α (/ β)-Phellandrene, Carene, Terpinene, Caryophyllene, (+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene, 10s,11s-Himachala-3(12),4-diene
Penicilium	Cyclohexylcyclohexanone, Propyl-2methylbutanoate, Ethyl-3(/2)-methylcrotonate, 3-Methylanisole, 4-Methylphenol, Isopropylbenzoate, 2-Purinol, Methylpentylcyclopropane, 2,3-Dimethylpentene, 6-Tridecene, α -Pinene, Limonene, β -Patchoulene, γ -Maalien, α -Cedrene, Valencene, Africanone, Ledol
Alternaria	Bicyclo[3.2.0]heptan-2-one, 2-Undecanone, Isobutylacetat, Hexanal, Benzaldehyde, Phenylacetaldehyde, unknown Sesquiterpen 1-4, γ -Muurolene
nonspecific	3-Methylbutanol, 1-Octen-3-ol, 3-Octanone, 2-Nonanone, Isomaltol, Ethyl-2-methylbutanoate, Isoamylacetat, Xylene, Styrene, 2-Phenylethanol, Cyclobutan, Longipinene, α -Guaiene, (+)-Aromadendrene, 2-(2-Ethyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetic acid

APCI-MS investigations for the characterization of the mVOC spectrum

The perspective goal of our work is the establishment of an online/on-site supervision system for grain storages based on an IM spectrometer. Since the ionization method used in IM spectrometry is APCI based on X-ray sources, the heatmap in figure 12 summarizes the results of the GC-APCI-MS investigations. These results are also relevant for the supervision of mold fungi contaminations by GC-APCI-MS. Compared to the combined GC-EI/APCI-MS investigations, the number of mVOC detected for the individual fungi is reduced from 86 to 67.

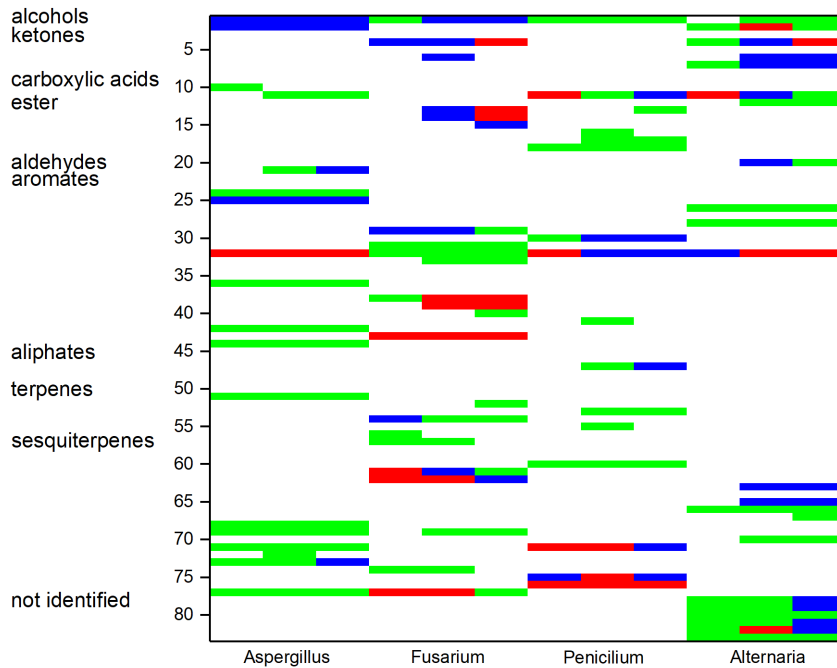


Fig. 12 Heatmap of mVOC detected by APCI-MS (secondary columns from left to right: wort, barley/malt and barley agar)

The substances not detected include mVOC in the trace range of practically all substance classes. Sampling was carried out either sequentially from one HSV or in parallel from two or more HSV. Therefore, in the case of sequential sampling, depletion effects can occur while in the case of parallel sampling, microbiological variability can be the cause. The substance classes which are less likely to undergo protonation by protonated water clusters due to their low PA are systematically not detected. These include carboxylic acids as well as certain substituted aromatics and aliphatics. Although several sesquiterpenes are more sensitively detected by APCI than by EI, individual sesquiterpenes are not ionized by APCI. The same is true for the terpenes.

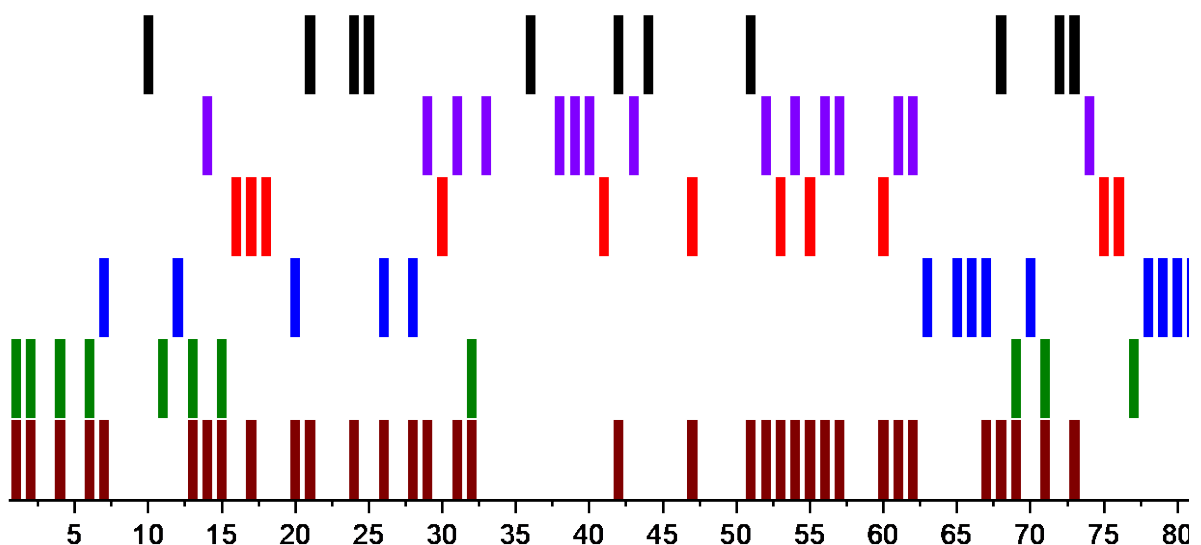


Fig. 13 Assignment of marker substances detected by APCI-MS in the headspace to the four fungus species (refer to Fig. 11 for colour code)

The lower number of detected substances also results in a reduction of the number of specific marker substances, as is observed in the comparison of Fig. 11 and 13. Nevertheless, even after considering the mVOC reported in the literature, specific marker compounds are found for each of the four fungus genera: 5 mVOC for *Aspergillus*, 7 for *Fusarium*, 6 mVOC for *Penicillium* and 11 mVOC for *Alternaria*. These can be used for a discrimination between the fungi by GC-IM spectrometry.

Conclusion

The metabolite spectrum of mVOC in the headspace of four fungus species was investigated by GC-El/APCI-MS and visualized in the form of heatmaps. 86 volatile metabolites could be identified. The detected metabolite spectra of each of the investigated fungus species differ significantly and can be used for the discrimination of the fungi. Although a consideration of the mVOC described for other fungi in the literature reduces the number of potential marker substances, the remaining specific marker compounds still allow a discrimination of the four fungus species. After limiting the investigation to the mVOC found by GC-APCI-MS in view of a potential on-site analysis, 67 of the mVOC found are still detected. These metabolites allow a confident discrimination of the four fungus species even after taking literature reported mVOC of other fungi into account. A representative mVOC standard was used to characterize the X-ray based APCI-source. The limits of detection found for the mVOC let a possible application of the new APCI source for the mobile supervision of grain storages by GC-APCI-MS or GC-APCI-IMS look promising.

Acknowledgement

The Authors gratefully acknowledge the financial support for this research received from the German Federal Ministry of Food and Agriculture and the administrative support through the Federal Office of Agriculture and Food (BLE, Grant No. 2814801811).

References

- [1] Miller, J. D., *J. Stored Prod. Res.* 1995, 31, 1–16.
- [2] Buško, M., Stuper, K., Jeleń, H., Góral, T., Chmielewski, J., Tyrakowska, B., Perkowski, J., *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 1243.
- [3] Savelieva, E. I., Gavrilova, O. P., Gagkaeva, T. Y., *J. Anal. Chem.* 2014, 69, 609–615.
- [4] Savelieva, E. I., Gustyleva, L. K., Kessenikh, E. D., Khlebnikova, N. S., Leffingwell, J., Gavrilova, O. P., Gagkaeva, T. Y., *Chem. Biodivers.* 2016, 13, 891–903.
- [5] Girotti, J., Malbrán, I., Lori, G., Juárez, M., *World Mycotoxin J.* 2010, 3, 121–128.
- [6] Demyttenaere, J. C. R., Moriña, R. M., De Kimpe, N., Sandra, P., *J. Chromatogr. A* 2004, 1027, 147–54.
- [7] Jelén, H. H., Mirocha, C. J., Wasowicz, E., Kamiński, E., *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 3815–20.
- [8] Ostry, V., *World Mycotoxin J.* 2008, 1, 175–188.
- [9] Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenbach, M., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007, 145, 58–86.
- [10] Lou, J., Fu, L., Peng, Y., Zhou, L., *Molecules* 2013, 18, 5891–5935.

- [11] Lemfack, M. C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., Piechulla, B., *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, D744–D748.
- [12] Weikl, F., Ghirardo, A., Schnitzler, J.-P., Pritsch, K., *Sci. Rep.* 2016, 6, 22152.
- [13] Jurjevic, Z., Rains, G. C., Wilson, D. M., Lewis, W. J., *Phytopathol. Mediterr.* 2009, 47, 266–271.
- [14] Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R., Dott, W., *Chemosphere* 1999, 39, 795–810.
- [15] Takeuchi, T., Kimura, T., Tanaka, H., Kaneko, S., Ichii, S., Kiuchi, M., Suzuki, T., *Surf. Interface Anal.* 2012, 44, 694–698.
- [16] Costa, C. P., Gonçalves Silva, D., Rudnitskaya, A., Almeida, A., Rocha, S. M., *Sci. Rep.* 2016, 6, 27441.
- [17] Cassagne, C., Normand, A.-C., L'Ollivier, C., Ranque, S., Piarroux, R., *Mycoses* 2016, 59, 678–690.
- [18] Li, D.-X., Gan, L., Bronja, A., Schmitz, O. J., *Anal. Chim. Acta* 2015, 891, 43–61.
- [19] Riebe, D., Erler, A., Ritschel, T., Beitz, T., Löhmannsröben, H.-G., Beil, A., Blaschke, M., Ludwig, T., *J. Mass Spectrom.* 2016, 51, 566–577.
- [20] Röst, H. L., Sachsenberg, T., Aiche, S., Bielow, C., Weisser, H., Aicheler, F., Andreotti, S., Ehrlich, H.-C., Gutenbrunner, P., Kenar, E., Liang, X., Nahnsen, S., Nilse, L., Pfeuffer, J., Rosenberger, G., Rurik, M., Schmitt, U., Veit, J., Walzer, M., Wojnar, D., Wolski, W. E., Schilling, O., Choudhary, J. S., Malmström, L., Aebersold, R., Reinert, K., Kohlbacher, O., *Nat. Methods* 2016, 13, 741–748.

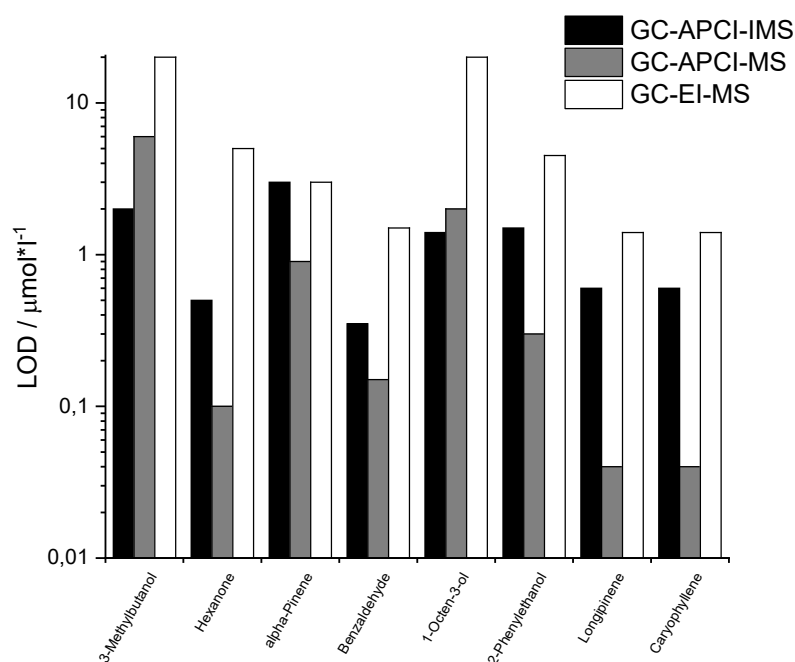
3.4. Charakterisierung flüchtiger Schimmelpilzmetabolite auf Gerste durch Massen- und Ionenmobilitätsspektrometrie

„Characterization of volatile metabolites formed by molds on barley by mass and ion mobility spectrometry“

Erler, A.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.;

Grothusheitkamp, D.; Kunz, T.; Methner, F.-J.

J Mass Spectrom. 2020; 55:e4501



Inhalt der Publikation und Beitrag des Autors:

Diese Publikation beschreibt in Fortsetzung zur vorangegangenen die Detektion von flüchtigen Schimmelpilzmetaboliten über Gerste. Die Pilze gehören zu vier verschiedenen Gattungen, bei denen drei nochmals in verschiedene Spezies unterteilt wurden. Die Proben, welche von den Partnern der Technischen Universität Berlin hergestellt wurden, habe ich mittels Festphasenmikroextraktion aus verschlossenen Headspace-Gläsern überführt. Die beschriebenen Messungen wurden von mir an zwei GC-gekoppelten Massenspektrometern und einem GC-gekoppelten Ionenmobilitätsspektrometer durchgeführt. Das kommerziell erworbene IM-Spektrometer habe ich für die Kopplung modifiziert. Die Auswertung der Messungen, inklusive der Korrelation zwischen den drei Aufbauten und der Durchführung der Hauptkomponentenanalyse, wurde von mir durchgeführt. Ich war an der Diskussion der Ergebnisse beteiligt und habe die meisten der hier enthaltenen Abbildungen erstellt. Der Schreibprozess fand in enger Zusammenarbeit mit den Koautoren statt.

Manuscript of

Characterization of volatile metabolites formed by molds on barley by mass and ion mobility spectrometry

A. Erler¹, D. Riebe¹, T. Beitz¹, H.-G. Löhmannsröben¹, D. Grothusheitkamp², T. Kunz², F.-J. Methner²

¹ University of Potsdam, Physical Chemistry, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam, Germany

² Department of Food Technology and Food Chemistry, Technische Universität Berlin, Seestr. 13, 13353 Berlin, Germany

Abstract (247/150-250 words)

The contamination of barley by molds on the field or in storage leads to the spoilage of grain and the production of mycotoxins which causes major economic losses in malting facilities and breweries. Therefore, on-site detection of hidden fungus contaminations in grain storages based on the detection of volatile marker compounds is of high interest. In this work, the volatile metabolites of ten different fungus species are identified by gas chromatography (GC) combined with two complementary mass spectrometric methods, namely electron impact- (EI) and chemical ionization at atmospheric pressure (APCI) mass spectrometry (MS). The APCI source utilizes soft X-radiation which enables the selective protonation of the volatile metabolites largely without side-reactions. Nearly 80 volatile or semivolatile compounds from different substance classes, namely alcohols, aldehydes, ketones, carboxylic acids, esters, substituted aromatic compounds, alkenes, terpenes, oxidized terpenes, sesquiterpenes and oxidized sesquiterpenes, could be identified. The profiles of volatile and semivolatile metabolites of the different fungus species are characteristic of them and allow their safe differentiation. The application of the same GC parameters and APCI source allows a simple method transfer from MS to ion mobility spectrometry (IMS) which permits on-site analyses of grain stores. Characterization of IMS yields limits of detection very similar to those of APCI-MS. Accordingly, more than 90 % of the volatile metabolites found by APCI-MS were also detected in IMS. In addition to different fungus genera, different species of one fungus genus could also be differentiated by GC-IMS.

Keywords: ion mobility spectrometry, APCI, mass spectrometry, mold, fungus, gas chromatography, soft X-ray

1. Introduction

Barley, as one example of a cereal grain, can be infested by molds on the field or in storage, leading to the spoilage of grain and the production of mycotoxins. This contamination causes major economic losses in malting facilities and breweries [1]. One example of a field pest is the genus *Fusarium*, whereas *Aspergillus* is an example of storage pests. *Penicillium* can be attributed to both categories depending on the exact species. *Fusarium* is among the most important grain pathogens. Besides harvest losses, a major issue is the formation of mycotoxins. In addition to the nonvolatile mycotoxin metabolites, a wide spectrum of 50 volatile and 53 semivolatile metabolites (microbial volatile organic compounds, mVOC) is also produced by different *Fusarium* species [2–4]. An important class of semivolatile metabolites are the sesquiterpenes, which serve as building blocks in the biosynthesis of mycotoxins [5–7]. Other fungi, encountered as field or storage pest alike, are various *Alternaria* [8–11], *Aspergillus* [12–14] and *Penicillium* species.

In the laboratory, the detection and identification of fungi is based on cell cultivation, which is usually time-consuming. Thus, approaches based on the detection of molecules, such as MALDI-MS [15] and subsequent database matching of the fingerprint spectra, are being developed. An alternative is the search for characteristic volatile marker compounds in the headspace above the fungi. Advantages of this method are the possibility of detecting hidden fungus contaminations in grain storages and contributing to the characterization of the metabolome of the fungi. The search for the characteristic volatile markers is based on active or passive headspace sampling and subsequent analysis by gas chromatography (GC) and electron ionization (EI)-MS [8,16]. The identification of the metabolites occurs mainly via the fragment ion patterns by (NIST) database matching. However, for many substances no molecular ion peak is found, reducing the reliability of the assignment. This issue is addressed by atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [17], where protonated molecular ions are predominantly formed. In this regard, EI and APCI are complementary ionization methods. Commercial APCI sources in MS are based on corona discharges. Although the corona discharge source is inexpensive, it has some disadvantages such as additional, competing ionization processes and the limited lifetime of the corona needle. Our group already demonstrated the application of an alternative APCI source based on soft X-radiation in MS. In two publications detailing the detection of explosives in the negative mode [18] and the detection of volatile metabolites of fungi in the positive mode [19], we could show that the underlying ionization mechanism is more selective. These miniature X-ray sources, which are not subject to any legal regulations in Germany (photon energy EX-ray < 5 keV), have already been introduced as alternatives for radioactive ⁶³Ni sources in ion mobility (IM) spectrometers, e. g. by the company Bruker Daltonics (Leipzig, Germany).

Since APCI mass spectrometers are instruments usually confined to the laboratory, mobile instruments are required for on-site analyses of grain stores. IMS is an analytical method with the potential for headspace (HS) screening of environmental and biological samples, which has already been demonstrated [20]. Additionally, handheld IM spectrometers are commercially available. One application is the HS investigation of olive oils by IMS, which allows the detection of components (terpenes) in olive oil [21], the classification of olive oils [22] and non-targeted olive oil profiling [23]. Other examples are the detection of odors in the environment [24], off-flavors in foods [25], fungal infestations of wood [26], the identification of human pathogenic bacteria and fungi [27,28] and breath analysis [29].

In this work, our previous HS-GC-EI/APCI-MS investigations of different fungi on agar [19] were extended to fungus-contaminated barley grains. The aim was the identification of volatile fungus metabolites. In a second step, the MS method was transferred to IMS, and HS-GC-APCI-IM spectrometric investigations of fungus-contaminated barley grains were carried out. These experiments demonstrated the potential of IMS for on-site monitoring of hidden fungus contaminations in grain storages. The application of the same GC and X-ray-based APCI source in both hyphenation methods allows a straight method transfer.

2. Experimental Part

Microbiological sample preparation. The investigated samples were composed of sterilized barley grain inoculated with a spore suspension of the corresponding fungus. The grain contained about 30 % of water. After the inoculation the sample vials were rotated for 15 minutes to ensure even distribution of the spore suspension. 6 g of the sample were placed inside a headspace vial. The suspension was produced from different breeding media (each including a fungus), that were suspended in a 0.9 % NaCl solution and filtered subsequently. The fungus cultures used were obtained from culture collections (Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; VLB- Brewery Research and Education Center Berlin) or were isolated from contaminated grain samples. The investigated field pests were *Fusarium culmorum* (DSMZ 62191), *Fusarium graminearum* (VLB reference stocks), *Fusarium* sp. (isolate from deoxynivalenol-contaminated diastase wheat, called here *F. DW 14*) and *Alternaria alternata* (isolate from brewing barley). The investigated storage pests were *Aspergillus niger* (DSMZ 22593), *Aspergillus ficuum* (DSMZ 932/NRRL 3135), *Aspergillus versicolor* (DSMZ 63292) and three different *Penicillium* spp. (isolate from brewing barley, called here *P. Pen A*, *P. Pen 14*, *P. Pen R*). Through DNA analysis *P. Pen R* was found to be either *P. camembertii* or *P. griseovulvum* and *A. alternata* was identified. This analysis was carried out at the Research Center Weihenstephan for Brewing and Food Quality (Technical University of Munich) via polymerase chain reaction- (PCR) sequencing of the rDNA and comparison with the Blast Search database.

Headspace Characterization. After a growth period of 8 days, the headspace vials were hermetically sealed and left for another 48 hours, stopping the fungus growth. A solid-phase microextraction (SPME) fiber, coated with divinylbenzene, carboxen and polydimethylsiloxan, was used for sampling. The volatile compounds in the headspace were adsorped onto the fiber over a periode of one hour at a temperature of 45 °C. Desorption was performed in the GC injector at 250 °C for 1 minute.

Headspace investigations of fungi were carried out with GC-EI-MS (7890A GC, 5975C MSD, Agilent Technologies) and GC-APCI-MS (5890 Series II GC, Hewlett Packard, LTQ XL, Thermo Fisher Scientific) which were already described in detail previously [19]. For both MS methods the same type of GC columns, but different inner diameters (15 m x 0.25/0.32 mm x 1.0 µm), containing poly(5% diphenyl-95% dimethylsiloxan) as the active phase were used for the pre-separation of the substances. The same GC temperature program was used as well: initial period of 5 min at 32 °C followed by a heating phase with 10 °C/min and a final period at 200 °C for 8 min.

The handheld IM spectrometer (Roadrunner, Bruker Daltonics, Leipzig) has an APCI source based on soft X-radiation (miniature X-ray tube, 40 mm length, rhodium target on a beryllium window), with an

energy of 2.7/2.8 keV (L_{α}/L_{β} -transitions of Rh) and is therefore exempt from registration in Germany. The same type of source was used in the APCI-MS system (LTQ XL, Thermo Fisher Scientific), where it was integrated into a home-built ionization chamber [18,19]. The original application scenario of the Roadrunner instrument is the detection of explosives and drugs on surfaces. In order to couple the spectrometer (95 mm length of the drift tube) to a GC (same GC as used in GC-APCI-MS), modifications had to be made. The original thermal desorption unit was replaced by a home-made heated (180 °C) inlet system for the GC capillary. Additionally, the internal drift gas cycle was modified and an external drift gas (nitrogen, 400 ml/min) was applied. The resolution of the spectrometer in the GC configuration is around 40. The Roadrunner spectrometer was set to the maintenance mode which allows long-term GC measurements. The temperature program in the GC was slightly changed in order to improve the resolution: initial period of 30 °C prior to a heating phase with 20 °C/min and a final period at 200 °C for 10 minutes. A custom python script was written for format conversion of the Bruker data file to the data formats of OpenMS and Origin where the data evaluation and visualization was performed.

The spectra resulting from GC-EI-MS, GC-APCI-MS and GC-APCI-IMS measurements were correlated using the GC retention time. Because an alkane standard generally applied for determination of retention indices cannot be used in APCI-MS or APCI-IMS, a fatty acid methyl ester mixture consisting of $C_nH_{2n+1}COOCH_3$ ($n = 8-20$ for even n) was used. Furthermore, GC-APCI-MS and GC-APCI-IMS were characterized by a mixture of representative volatile fungus metabolites. This mVOC standard contained 3-methylbutanol (a, 2 mM), 2-hexanone (b, 50 μ M), α -pinene (c, 300 μ M), benzaldehyde (d, 50 μ M), 1-octen-3-ol (e, 200 μ M), 2-phenylethanol (f, 150 μ M), longipinene (g, 20 μ M) and caryophyllene (h, 20 μ M). All substances were purchased from Sigma-Aldrich.

3. Results

Characterization of the GC-IM spectrometer. The aim of this work was the characterization of the mVOC spectrum in the headspace above barley grains contaminated with fungi by a mobile analytical instrument based on GC-IMS. In order to enable a direct method transfer from previous GC-MS experiments, the same gas chromatograph, column and method parameters (flow rates, temperature program) were used in GC-IMS. This allows the simple assignment of mVOC already identified by GC-MS to the peaks in the 2D-GC-IM spectra through correlation of the retention indices. Furthermore, the method was characterized by a standard which contains representatives (volatile metabolites) of the most important substance classes in the fungi headspace. The IM spectrometer used was a handheld instrument equipped with the same soft X-radiation source that was previously utilized in APCI-MS. This allows a simple transfer of method parameters from the mass spectrometer to the IM spectrometer. Because the original application purpose of the highly specialized handheld instrument is the detection of explosives and narcotics in baggage check-ins of airports, which are sampled by swipes, a GC connection is not intended in the instrument. Therefore, the inlet part and internal gas flows of the instrument had to be modified. While the focus of the modification of the inlet part was on the prevention of cold spots, the optimization of the gas flows improves sensitivity and resolving power of the instrument. The sampling procedure is based on the adsorption of volatile compounds on a SPME fiber.

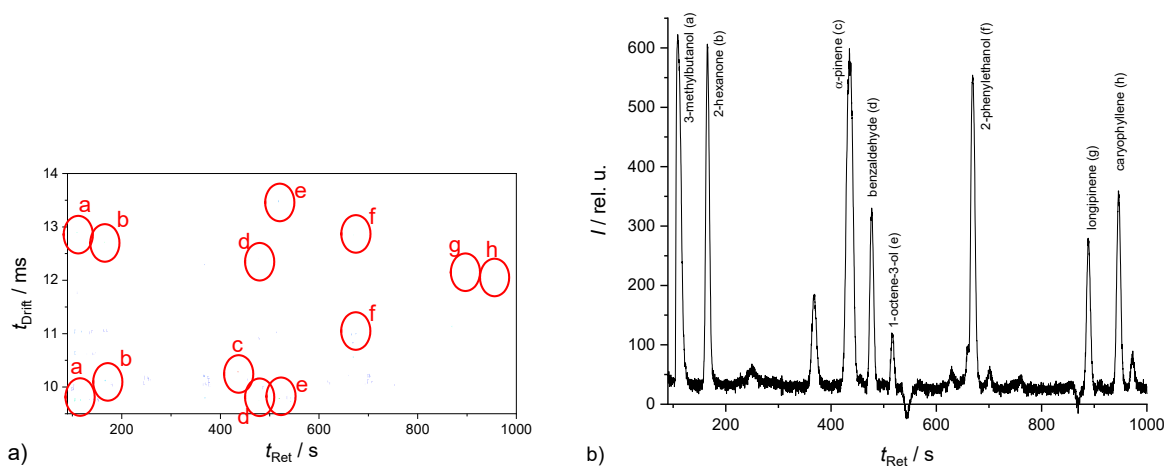


Fig. 1 a) 2D-spectrum (drift time t_{Drift} vs. retention time t_{Ret}) of the representative volatile fungus metabolites mixture, b) GC-chromatogram computed by summation of GC traces at various drift times (corresponding to substance maxima in IM spectra) of the same mixture.

Figure 1a shows the 2D-spectrum of the representative volatile fungus metabolites mixture, which includes mVOC of the most important substance classes. The 2D-spectrum consists of the two dimensions retention time and drift time. For most compounds, two peaks are found which can be assigned to the protonated monomer and dimer ions. All peaks are well separated and have a symmetric shape in both dimensions. The signal intensity (current I) as sum of the selected ion traces in the retention time dimension is displayed in Fig. 1b. The GC peaks are highly symmetric, which is an indication of the absence of memory effects in the IM spectrometer.

The formation of mVOC as volatile metabolites of fungi can occur over a wide and mostly unknown concentration range. Another challenge is the strong variation of the response values of the compounds in APCI [19]. Therefore, a quantitative description of the mVOC space would require an extensive calibration of each substance. However, many compounds are not commercially available. Calibration plots of five representative mVOC deriving from GC-APCI-IMS measurements are shown in Fig. 2, as examples of the concentration ranges and sensitivities of the mVOC detection. The calibration plot after direct injection of liquids is shown in Fig. 2a, and the calibration plot after total evaporation of 2 μl solution and subsequent adsorption of the mVOC on an SPME fiber is displayed in Fig. 2b. While the different calibration curves in Fig. 2a are the result of different response factors of the APCI source, the calibration curves in Fig. 2b additionally include the effect of different adsorption equilibria of the mVOC on the SPME fiber. Linear detection ranges cover two orders of magnitude. The estimated limits of detection (LOD) are slightly lower for direct injection of liquids and are in the upper nanomolar range. The small differences of both curves indicate efficient sampling of the mVOC by SPME.

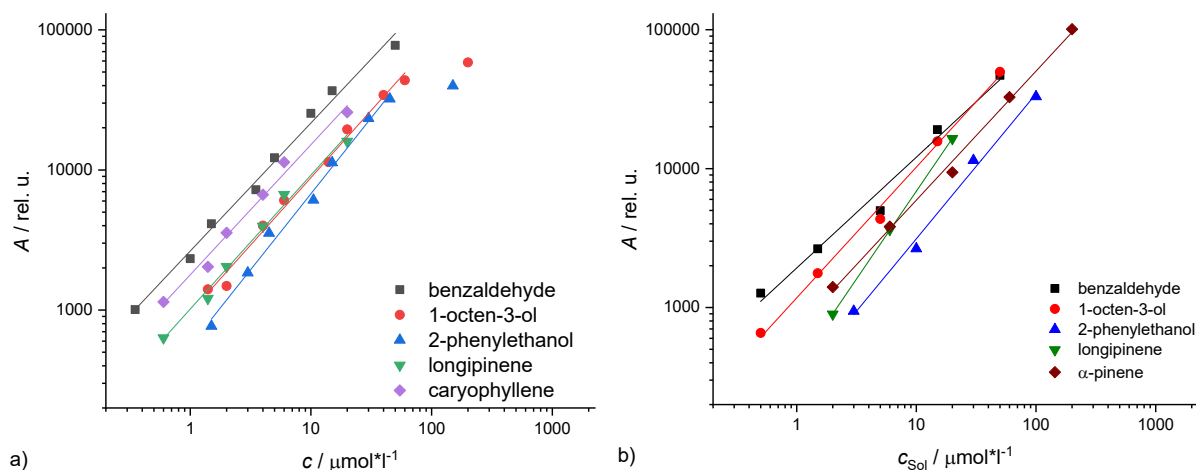


Fig. 2 Calibration plots (double-log representation) of selected compounds of the mVOC mixture injected into the GC-APCI-IMS a) as 1 μl liquid sample and b) after desorption of the SPME fiber in the injector after total evaporation of 2 μl liquid sample. A refers to the peak area, c to the concentration in the injected liquid and c_{sol} to the concentration in the solution below the headspace.

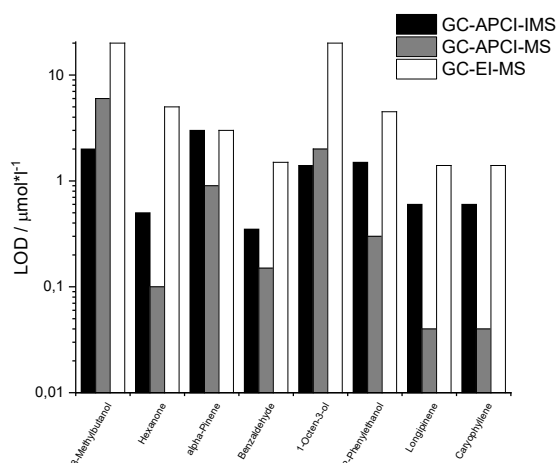


Fig. 3 LOD of eight mVOC for three detection methods: GC-EI-MS (brown bars), GC-APCI-MS (green bars) and GC-IMS (black bars).

The mVOC were identified by GC-EI-MS and GC-APCI-MS investigations. The results of the MS methods can only be transferred to IMS if the detection ranges of both methods are similar. Furthermore, IMS is only useful for on-site detection and identification of fungi if the LOD are low enough. In Fig. 3, the LOD of eight mVOC measured by the mass- and IMS-based methods are compared. The most important result is that the LOD of APCI-MS and APCI-IMS are in the same range except for the sesquiterpenes. It is interesting to note that both in-house modified APCI instruments are more sensitive than the commercial EI-MS instrument. This is very likely an effect of the different ionization efficiencies of the two sources.

MS investigation of mVOC formed by fungi on barley grain. In our previous publication [19], the results of headspace monitoring of fungi on different agar substrates by MS were reported. The result of the complementary EI/APCI investigation was an overview of all detected mVOC sorted by substance

classes. Marker substances allowing the specific detection of individual fungi were searched in this dataset. In the current work, these investigations were additionally performed for barley grains contaminated by fungi. In a first step, the mVOC were identified by both GC-EI-MS and GC-APCI-MS measurements. Specific marker substances were identified from the resulting mVOC lists. These experiments were extended to IM spectrometric measurements in order to verify the potential of this mobile on-site analytical method for monitoring grain stores. In addition to the differentiation of fungus genera, the potential of IMS for the differentiation of several species of one fungus genus was explored.

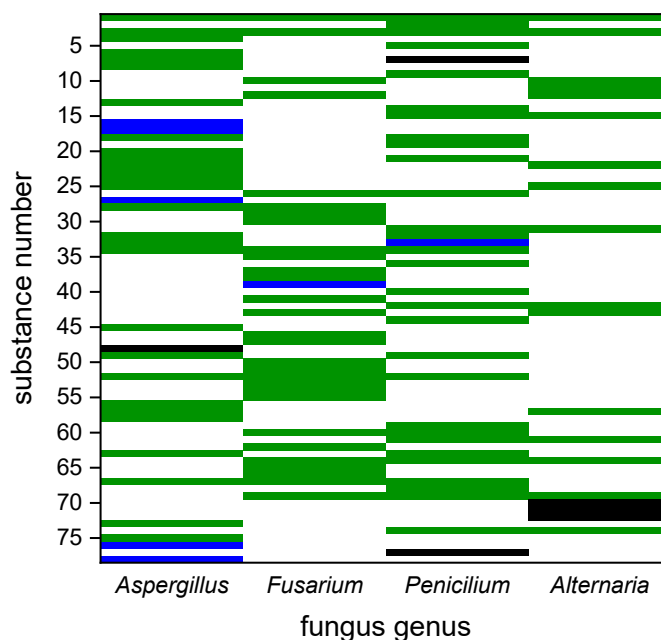


Fig. 4 Heatmap of the mVOC detected in the headspace of 4 fungus species belonging to different genera, color code: green – detection by EI-MS and APCI-MS, black – detection by APCI-MS only, blue – detection by EI-MS only, substance numbers according to the following substance classes: 1-5 alcohols, 6-8 aldehydes, 9-12 ketones, 13 carboxylic acid, 14-16 esters, 17-34 substituted aromatic compounds, 35-36 alkenes, 37-40 terpenes, 41 oxidized terpenes, 42-72 sesquiterpenes, 73-74 oxidized sesquiterpenes, 75-78 other compounds, refer to table 1 in supplementary information

The mVOC detected by EI-MS and APCI-MS are presented in a heatmap (Fig. 4). The four columns represent the detected volatile metabolites for the different fungus species *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Alternaria*, which all belong to different genera. The color code indicates the MS methods used to detect the mVOC. 78 substances were found and are arranged according to their substance classes. These substance classes include alcohols (5 mVOC), aldehydes (3 mVOC), ketones (4 mVOC), carboxylic acids (1 mVOC), esters (3 mVOC), substituted aromatic compounds (18 mVOC), alkenes (2 mVOC), terpenes (4 mVOC), oxidized terpenes (1 mVOC), sesquiterpenes (31 mVOC), oxidized sesquiterpenes (2 mVOC) and additional non-identified substances. A detailed list of all compounds can be found in the supplementary material (Table 1). Most substances (91 %) were detected by both ionization methods. Another heatmap providing a semiquantitative representation of the APCI-MS results is shown in Fig. 5. Due to the varying and often unknown response factors, the mVOC concentrations were determined only semi-quantitatively and classified as major components (red), minor components (blue), and traces (green) in this work.

Compared to the headspace measurements on agar [19], the number of detected mVOC has slightly changed due to the influence of the different substrates. In detail, the transition from different agar substrates to barley results in a decrease of the total number of mVOC detected by GC-EI-MS from 86 to 78, while the total number of mVOC detected by GC-APCI-MS increases from 67 to 73. This finding indicates that the number of unpolar mVOC decreases and the number of the more polar substances slightly increases.

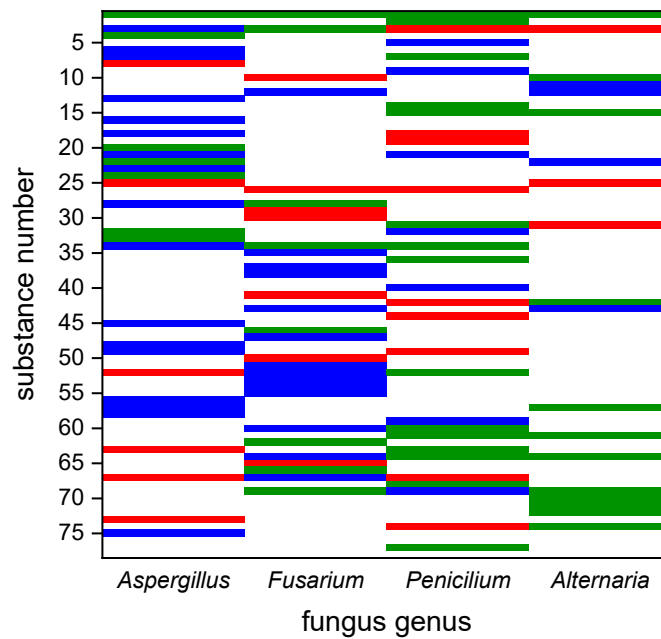


Fig. 5 Heatmap of the mVOC detected by APCI-MS in the headspace of 4 fungus species belonging to different genera, color code: red – major components, blue – minor components, green – traces

A brief glance already reveals that the mVOC for the 4 fungus species form characteristic patterns that differ significantly from each other. Within the framework of the four fungus species investigated, 50 mVOC of all 78 mVOC detected by EI-MS and 45 mVOC of all 73 mVOC detected by APCI-MS are specific to the four fungi and can thus potentially be used as marker substances. More details are shown in Fig. 6a for the APCI-MS experiments. 15 mVOC are specific to *Aspergillus* spp., 16 mVOC are specific to *Fusarium* spp., 11 mVOC are specific to *Penicillium* spp. and 4 mVOC are specific to *Alternaria* spp. The remaining mVOC were found in the headspace of at least two fungi and were classified as nonspecific. Several substances classified as specific in this work were reportedly detected in the headspace of other microorganisms in the literature (see supplementary material table 2) and have to be reclassified as nonspecific. Therefore, the number of specific substances is strongly reduced. Then, as shown in Fig. 6b, 7 mVOC are specific to *Aspergillus* spp., 9 mVOC are specific to *Fusarium* spp., 7 mVOC are specific to *Penicillium* spp. and 3 mVOC are specific to *Alternaria* spp. In the future with continuing research worldwide, the number of substances specific to a fungus species will furthermore decrease since more mVOC will be discovered in the headspace of other microorganisms which are now classified as specific mVOC. Otherwise, this procedure of comparison with literature results is conservative because the number of non-specific substances found represents an upper limit, since not all microorganisms will occur together at one place in the field or in storage.

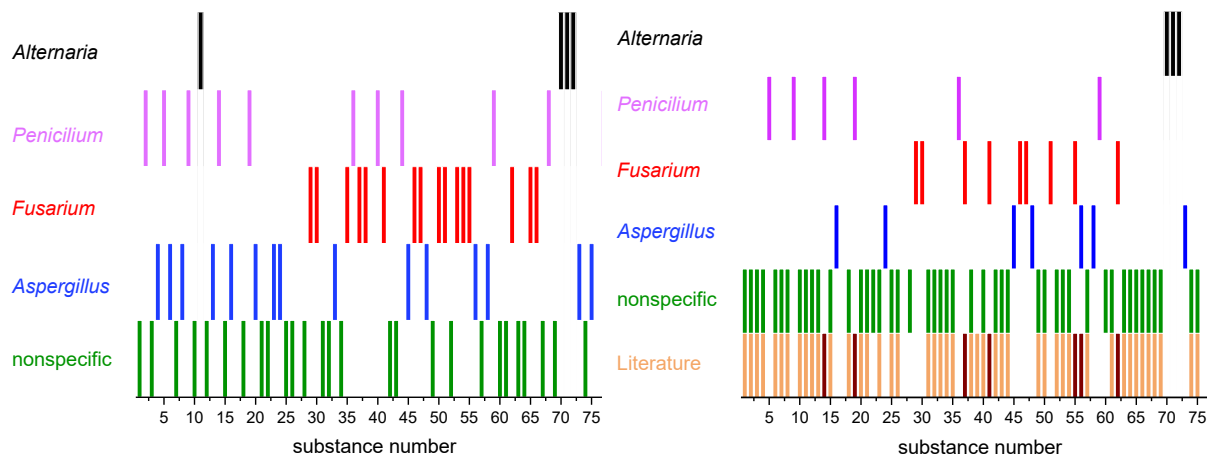


Fig. 6 Representation of specific and nonspecific metabolites found by APCI-MS with regard to a) the results of this work and b) the literature. Seven of the found substances were described as specific in the literature as well (dark brown bars).

Detection of fungi by ion mobility spectrometry based on mVOC. Headspace investigations were also carried out by GC-IMS. Analogous to the 2D GC-APCI-MS spectra (m/z vs. t_{Ret}), two-dimensional (t_{Drift} vs. t_{Ret}) spectra are also obtained in GC-APCI-IMS. 2D spectra comparing GC-APCI-MS and GC-APCI-IMS for one species are shown in Fig. 7. IMS has a lower resolution than MS, but in connection with the GC pre-separation, most marker peaks can reliably be separated from surrounding mVOC peaks.

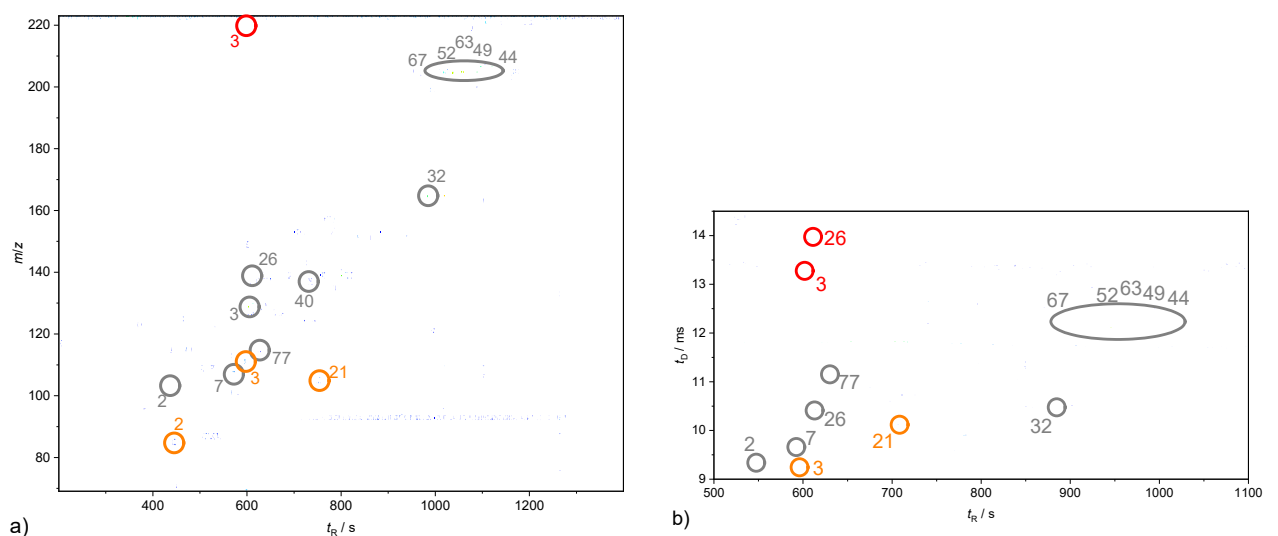


Fig. 7 2D spectra of the mVOC from *P. Pen 14* obtained by a) GC-APCI-MS and b) GC-APCI-IMS (gray – $[M+H]^+$, orange – $[M-OH]^+$, red – $[2M+H]^+$)

A detailed examination shows that 92 % of the mVOC peaks found in APCI-MS are also detected by APCI-IMS. The mVOC detected in the headspace of the four fungi can be summarized in a heatmap (Fig. 8).

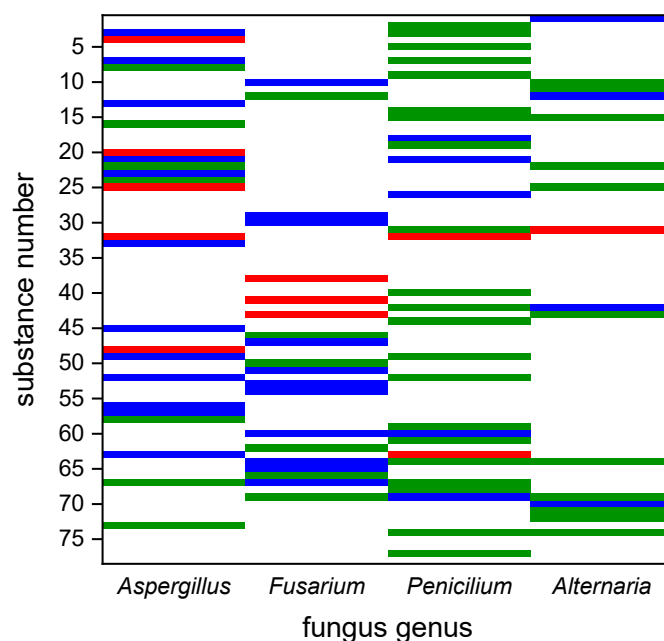


Fig. 8 Heatmap of the mVOC detected by APCI-IMS in the headspace of 4 fungus species belonging to different genera, color code: red – major components, blue – minor components, green – traces

Similar to Fig. 5, different mVOC patterns measured by APCI-IMS were obtained for the four fungus species belonging to different genera. Furthermore, characteristic marker substances were identified that only appear in the headspace of the corresponding fungus species. Regarding the four fungi, 43 of 66 mVOC found in APCI-IMS are potential specific marker compounds. In detail, for *Aspergillus* spp. 14 specific mVOC, for *Fusarium* spp. 13 specific mVOC, for *Penicillium* spp. 11 specific mVOC and for *Alternaria* spp. 5 specific mVOC were found by APCI-IMS.

The mVOC patterns of fungi belonging to different genera feature strong variations. Contrary to this, the distinction of different fungus species of one genus should pose a larger challenge. This question was investigated for the example of three species, each of the three fungus genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium*, applying both APCI-MS and APCI-IMS. APCI-IMS is able to detect most of the compounds which are detected by APCI-MS. In detail, the match between mVOC detected by IMS and MS is 88 % for *Aspergillus*, 87 % for *Fusarium* and 93 % for *Penicillium*. This finding is also supported by Fig. 9. The left column shows the mVOC patterns detected by APCI-MS and the right column the corresponding mVOC patterns detected by APCI-IMS. Both are very similar.

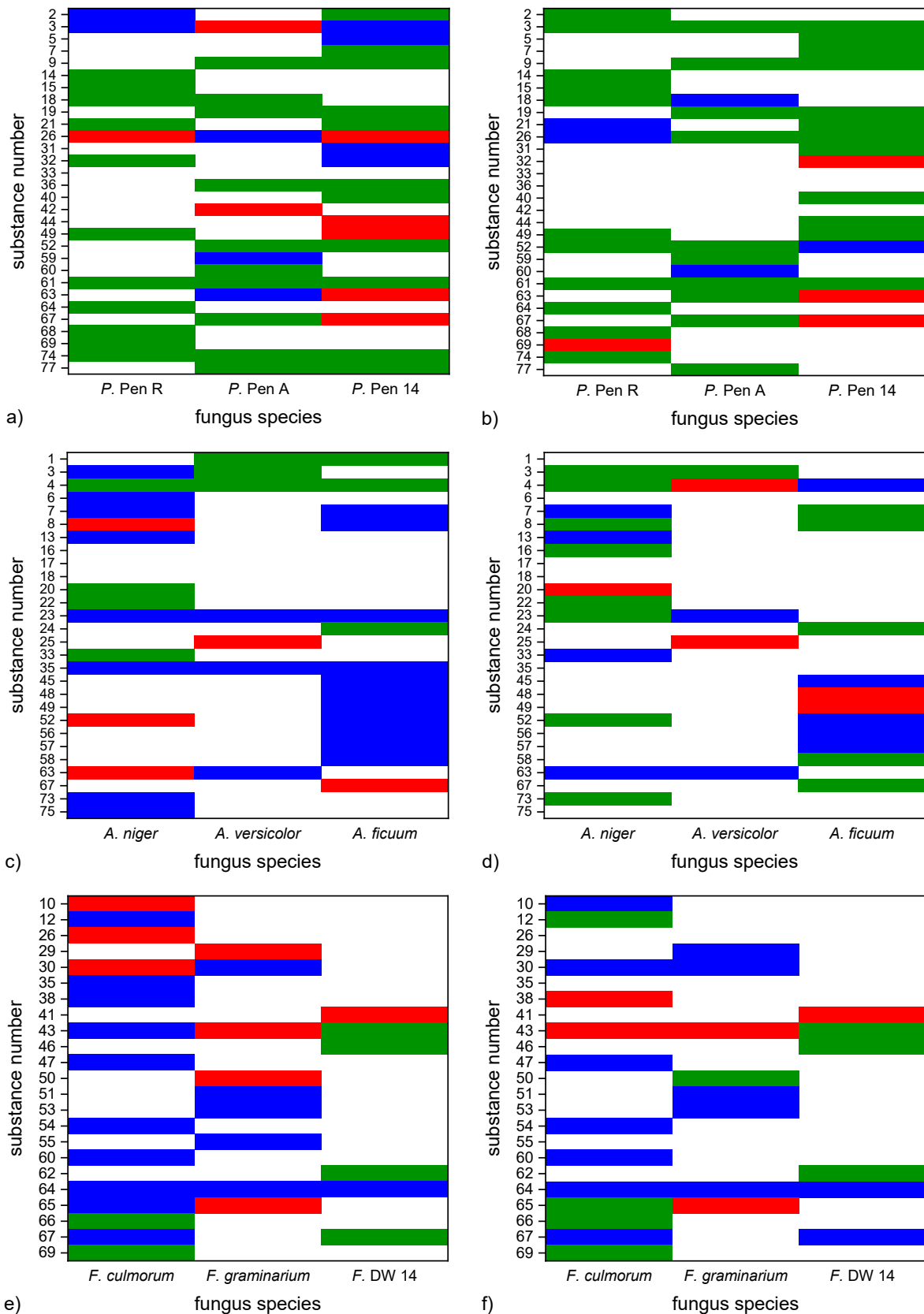


Fig. 9 Heatmaps for three *Penicillium* species detected by a) APCI-MS and b) APCI-IMS; three *Aspergillus* species detected by c) APCI-MS and d) APCI-IMS; three *Fusarium* species detected by e) APCI-MS and f) APCI-IMS

A brief survey of the mVOC signatures of the three fungus genera (see Fig. 9 a, c and e) show strong differences as was discussed in detail above. As expected, the differences become smaller if the

respective three species of each fungus genus *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* (e.g. in Fig. 9 a, c or e) are compared. This finding is especially pronounced in Fig. 9a. Of the 15 compounds detected for *P. Pen A*, three mVOC are also observed in the headspace of the other two *Penicillium* species, nine mVOC are also observed in the headspace of one of the other two *Penicillium* species and three mVOC are only observed for *P. Pen A*. Thus, the latter three compounds can be regarded as potential marker compounds for *Penicillium Pen A*. Summarizing all heatmaps in Fig. 9, for *Aspergillus* 28 % of the mVOC are potential markers for species *A. niger*, 4 % for species *A. versicolor* and 32 % for species *A. ficuum*. For *Fusarium*, 43 % of the mVOC are potential markers for species *F. culmorum*, 22 % for species *F. graminearum* and 13 % for species *F. DW 14*. Finally, for *Penicillium* 17 % of the mVOC are potential markers for species *P. Pen R*, 10 % for species *P. Pen A* and 17 % for species *P. Pen 14*.

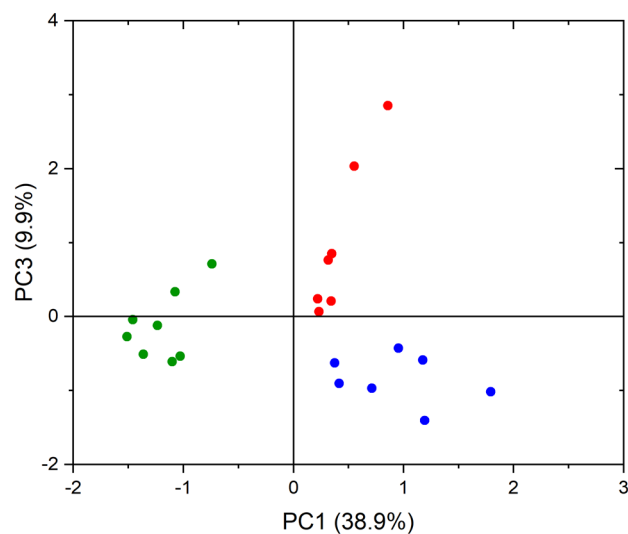


Fig. 10 Score plot of the PCA of the GC traces (GC-IMS) of the three *Aspergillus* species (color code: *A. ficuum* – blue, *A. niger* – red, *A. versicolor* – green)

As an alternative to the very time-consuming marker search, principal component analysis (PCA) of the GC traces of three fungus species was carried out. The aim was to establish a fast, non-supervised classification method for fungi based on the GC traces of the GC-IMS measurements, without detailed time-consuming evaluation of all spectra. This analysis based on PCA was demonstrated for the three *Aspergillus* species as shown in Fig. 10. In the score plot, the first and third principal component are displayed which together account for 49 % of the variance. Each point in the score plot represents one fungus sample. The following color code was applied: *Aspergillus ficuum* (blue), *Aspergillus niger* (red) and *Aspergillus versicolor* (green). The different fungus samples cluster in three different groups according to the corresponding three *Aspergillus* species. These three different clusters are clearly separated. Therefore, unknown samples can potentially be classified by PCA using the GC traces without further time-consuming data evaluation. It is worth noting that the PCA classification was not only possible for fungus species of one genus but fungi of different genera could also be differentiated.

4. Conclusions

The investigation of volatile and semivolatile metabolites in the headspace above barley allows the detection and identification of fungi. The metabolites were identified by complementary GC-EI-MS and GC-APCI-MS investigations. The mVOC profiles of the fungi investigated have a different pattern,

allowing their differentiation. In these mVOC patterns, characteristic marker substances could be found for each fungus. The detection of these marker substances provides a reliable method for the identification of the corresponding fungus. Ion mobility spectrometry, a technique which can be performed with commercially available handheld instruments, potentially allows the on-site detection of fungus contaminations in grain stores. Based on the application of the same GC parameters and APCI source, a simple method transfer from MS to IMS is possible. Despite the lower resolution of IMS in comparison to MS, most mVOC could be completely separated in GC-APCI-IMS. A characterization of GC-APCI-IMS yields comparable LOD to GC-APCI-MS. This high sensitivity is also reflected in the detection of nearly 90 % of the mVOC detected by GC-APCI-MS by GC-APCI-IMS. In addition to the distinction of different fungus genera, different species of one fungus genus can be distinguished by GC-APCI-based ion mobility spectrometry.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support for this research received from the German Federal Ministry of Food and Agriculture and the administrative support from the Federal Office of Agriculture and Food (BLE, grant no. 2814801811).

References

- [1] Miller, J. D., Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. *J. Stored Prod. Res.* 1995, 31, 1–16.
- [2] Buško, M., Stuper, K., Jeleń, H., Góral, T., Chmielewski, J., Tyrakowska, B., Perkowski, J., Comparison of Volatiles Profile and Contents of Trichothecenes Group B, Ergosterol, and ATP of Bread Wheat, Durum Wheat, and Triticale Grain Naturally Contaminated by Mycobiota. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 1243.
- [3] Savelieva, E. I., Gustyleva, L. K., Kessenikh, E. D., Khlebnikova, N. S., Leffingwell, J., Gavrilova, O. P., Gagkaeva, T. Y., Study of the Vapor Phase Over *Fusarium* Fungi Cultured on Various Substrates. *Chem. Biodivers.* 2016, 13, 891–903.
- [4] Savelieva, E. I., Gavrilova, O. P., Gagkaeva, T. Y., Using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the study of the volatile products of biosynthesis released by plants and microorganisms. *J. Anal. Chem.* 2014, 69, 609–615.
- [5] Jelén, H. H., Mirocha, C. J., Wasowicz, E., Kamiński, E., Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 3815–20.
- [6] Demyttenaere, J. C. R., Morriña, R. M., De Kimpe, N., Sandra, P., Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species. *J. Chromatogr. A* 2004, 1027, 147–54.
- [7] Girotti, J., Malbrán, I., Lori, G., Juárez, M., Use of solid phase microextraction coupled to capillary gas chromatography-mass spectrometry for screening *Fusarium* spp. based on their volatile sesquiterpenes. *World Mycotoxin J.* 2010, 3, 121–128.
- [8] Weikl, F., Ghirardo, A., Schnitzler, J.-P., Pritsch, K., Sesquiterpene emissions from *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*: Effects of age, nutrient availability, and co-cultivation. *Sci. Rep.* 2016, 6, 22152.
- [9] Ostry, V., *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J.* 2008, 1, 175–188.
- [10] Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenbach, M., The Spectrum of Fungal Allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007, 145, 58–86.
- [11] Lou, J., Fu, L., Peng, Y., Zhou, L., Metabolites from *Alternaria* Fungi and Their Bioactivities. *Molecules* 2013, 18, 5891–5935.
- [12] Jurjevic, Z., Rains, G. C., Wilson, D. M., Lewis, W. J., Volatile metabolites associated with one

- aflatoxigenic and one nontoxigenic *Aspergillus flavus* strain grown on two different substrates. *Phytopathol. Mediterr.* 2008, 47, 266–271.
- [13] Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R., Dott, W., Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere* 1999, 39, 795–810.
- [14] Takeuchi, T., Kimura, T., Tanaka, H., Kaneko, S., Ichii, S., Kiuchi, M., Suzuki, T., Analysis of volatile metabolites emitted by soil-derived fungi using head space solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry: I. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani* and *Penicillium paneum*. *Surf. Interface Anal.* 2012, 44, 694–698.
- [15] Cassagne, C., Normand, A.-C., L'Ollivier, C., Ranque, S., Piarroux, R., Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* 2016, 59, 678–690.
- [16] Costa, C. P., Gonçalves Silva, D., Rudnitskaya, A., Almeida, A., Rocha, S. M., Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome. *Sci. Rep.* 2016, 6, 27441.
- [17] Li, D.-X., Gan, L., Bronja, A., Schmitz, O. J., Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Anal. Chim. Acta* 2015, 891, 43–61.
- [18] Riebe, D., Erler, A., Ritschel, T., Beitz, T., Löhmannsröben, H., Beil, A., Blaschke, M., Ludwig, T., Atmospheric pressure chemical ionization of explosives induced by soft X-radiation in ion mobility spectrometry: mass spectrometric investigation of the ionization reactions of drift gasses, dopants and alkyl nitrates. *J. Mass Spectrom.* 2016, 51, DOI: 10.1002/jms.3784.
- [19] Erler, A., Riebe, D., Beitz, T., Löhmannsröben, H.-G., Grothusheitkamp, D., Kunz, T., Methner, F.-J., Detection of volatile organic compounds in the headspace above mold fungi by GC-soft X-radiation-based APCI-MS. *J. Mass Spectrom.* 2018, 53, DOI: 10.1002/jms.4210.
- [20] Borsdorf, H., Mayer, T., Zarejousheghani, M., Eiceman, G. A., Recent Developments in Ion Mobility Spectrometry. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2011, 46, 472–521.
- [21] Rodríguez-Maecker, R., Vyhmeister, E., Meisen, S., Rosales Martinez, A., Kuklya, A., Telgheder, U., Identification of terpenes and essential oils by means of static headspace gas chromatography-ion mobility spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, 409, 6595–6603.
- [22] Garrido-Delgado, R., Mercader-Trejo, F., Sielemann, S., de Bruyn, W., Arce, L., Valcárcel, M., Direct classification of olive oils by using two types of ion mobility spectrometers. *Anal. Chim. Acta* 2011, 696, 108–115.
- [23] Gerhardt, N., Birkenmeier, M., Sanders, D., Rohn, S., Weller, P., Resolution-optimized headspace gas chromatography-ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS) for non-targeted olive oil profiling. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, 409, 3933–3942.
- [24] Borsdorf, H., Baldeweg, S., Löper, F., Höhnisch, M., Petrich, R., Mayer, T., The correlation of odors in the environment with ion mobility spectra patterns. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 2015, 18, 1–7.
- [25] Márquez-Sillero, I., Cárdenas, S., Sielemann, S., Valcárcel, M., On-line headspace-multicapillary column-ion mobility spectrometry hyphenation as a tool for the determination of off-flavours in foods. *J. Chromatogr. A* 2014, 1333, 99–105.
- [26] Hübert, T., Tiebe, C., Stephan, I., Detection of fungal infestations of wood by ion mobility spectrometry. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 2011, 65, 675–681.
- [27] Perl, T., Jünger, M., Vautz, W., Nolte, J., Kuhns, M., Borg-von Zepelin, M., Quintel, M., Detection of characteristic metabolites of *Aspergillus fumigatus* and *Candida* species using ion mobility spectrometry - metabolic profiling by volatile organic compounds. *Mycoses* 2011, 54, e828–e837.
- [28] Jünger, M., Vautz, W., Kuhns, M., Hofmann, L., Ulbricht, S., Baumbach, J. I., Quintel, M., Perl, T., Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: A new identification tool for human pathogenic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 93, 2603–2614.
- [29] Vautz, W., Nolte, J., Fobbe, R., Baumbach, J. I., Breath analysis—performance and potential of ion mobility spectrometry. *J. Breath Res.* 2009, 3, 036004.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei analytische Fragestellungen von agrarwirtschaftlicher Relevanz bearbeitet. Zum einen die Aufklärung der Nährstoffgehalte und anderer Bodenparameter in Agrarflächen mittels Laser-induzierter Breakdown Spektroskopie, zum anderen die Detektion von Schimmelpilzkontaminationen in Getreidelagern mittels Ionenmobilitäts- und Massenspektrometrie. Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Schaffung der analytischen Grundlagen für die Entwicklung nachhaltiger landwirtschaftlicher Prozesse. Das heißt, Methoden der modernen instrumentellen Analytik sollten verwendet werden, um die für eine effiziente Nutzung natürlicher Ressourcen notwendigen Parameter zu charakterisieren. Die entsprechenden Techniken sollten die dafür relevanten Analyten identifizieren und zuverlässig detektieren. Ihre Anwendung auf die jeweils vorliegende Fragestellung sollte getestet werden. Zudem sollte eine klare Interpretation der daraus gewonnenen Parameter erfolgen, um in weiterführenden Arbeiten die Entwicklung der großtechnischen Umsetzung dieser Erkenntnisse zu ermöglichen.

Eine Kartierung von Bodenbestandteilen ist die Voraussetzung für eine orts aufgelöste Bewirtschaftung von Agrarflächen, auch bekannt als precision agriculture. Dies soll einen effizienten Einsatz von Düngemitteln gewährleisten, indem eine heterogen vorliegende Verteilung von Nährstoffen durch eine entsprechende Einbringung von Hilfsstoffen ergänzt wird. Dadurch werden Effekte wie Mangelversorgung und/oder Überdüngung vermieden, was langfristig stabile Erträge ermöglicht und Umweltschäden minimiert.

Ein frühzeitiger Nachweis von Kontaminationen durch Mikroorganismen wie Schimmelpilzen dient nicht nur der Vermeidung von Gesundheitsrisiken für den Verbraucher, sondern auch der Verringerung von ökonomischen Verlusten durch große Mengen kontaminierter Abfälle. Zwar können die Pilze selbst im Lauf von Produktionsprozessen beseitigt werden, die durch sie angerichteten Schäden aber machen die betroffenen Getreideanteile für die Weiterverarbeitung unbrauchbar. Außerdem bilden sie als sekundäre Stoffwechselprodukte hochstabile Toxine, welche die gesamte Produktion bis zum Endprodukt unbeschadet überstehen können.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst, und ihre Bedeutung für die Entwicklung nachhaltiger Techniken im Agrarwesen diskutiert werden.

4.1. Bodeneigenschaften

Mittels der Laser-induzierten Breakdown-Spektroskopie sollten in der vorliegenden Arbeit verschiedene Bodenparameter untersucht werden. Dazu gehören die Gehalte (pflanzenverfügbarer) Makro- und Mikronährstoffe, der pH-Wert und der Humusanteil. Für die Herleitung der entsprechenden Zusammenhänge sollten verschiedene Methoden der multivariaten Datenanalyse herangezogen werden. Da die vorliegenden Messungen die Grundlage für spätere Vor-Ort-Untersuchungen bilden sollen, muss das System grundsätzlich mobil sein, und die Auswertung der Messungen muss möglichst zeitnah erfolgen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen dienen der Evaluierung der Laser-induzierten Breakdown Spektroskopie bezüglich der Anwendung als Analysenmethode für die Bodenkartierung. Zur besseren Kontrolle und Reproduzierbarkeit wurden diese Messungen unter Laborbedingungen

durchgeführt. Aus diesem Grund erfolgte hier eine Probenpräparation. Das heißt, die Bodenproben wurden luftgetrocknet, homogenisiert und mit einer definierten Menge Wasser versetzt. Anschließend wurden sie zu Tabletten gepresst und mit einem Handheld-LIB-Spektrometer vermessen. Dadurch sollte eine gleichmäßige Probenoberfläche erzeugt werden. So konnte gewährleistet werden, dass die Probe sich bei jedem Schuss im Laserfokus befand, womit eine Quelle für Schwankungen in den LIB-Spektren ausgeschlossen wurde.

LIB-Spektren und Bodennährstoffe

Abbildung 4 zeigt ein Beispiel eines LIB-Spektrums, das an einer Bodenprobe aufgenommen wurde. Das Spektrum zeigt einen hohen Grad an Komplexität mit zahlreichen Peaks unterschiedlicher Intensität. Diese wurden anhand eines Abgleichs mit der LIBS-Datenbank des National Institute of Standards and Technology (NIST) den verschiedenen Nährstoffen zugeordnet. Die entsprechenden Peaks sind im Spektrum durch farbige Markierungen gekennzeichnet. Insgesamt wurden 87 Peaks identifiziert, die von den zehn betrachteten Nährstoffen stammen.

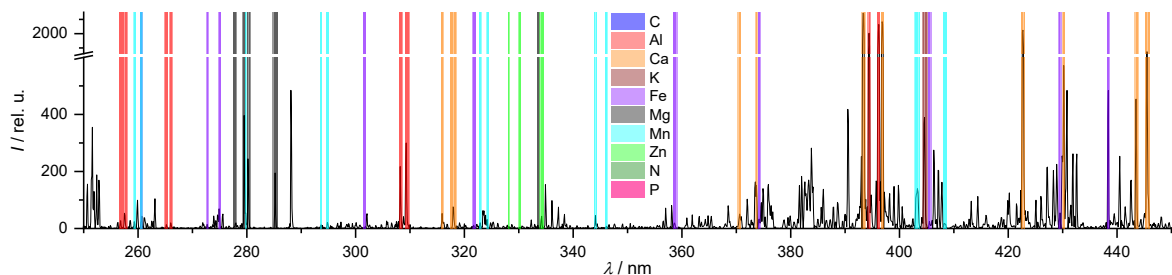


Abb. 4: Ausschnitt eines repräsentativen LIB-Spektrums der Bodenprobe einer landwirtschaftlich genutzten Fläche, Nährstoffpeaks farblich hervorgehoben und entsprechend gekennzeichnet; Spektrum aufgenommen mit LIBS-Handgerät Z-300 (SciAps Inc.)

Bei den gesuchten Nährstoffelementen handelt es sich um Eisen, Aluminium, Calcium, Magnesium, Kalium, Stickstoff, Phosphor, Mangan und Zink. Die Gehalte dieser Nährstoffe wurden im Zuge referenzanalytischer Untersuchungen mittels nasschemischem Aufschluss und ICP-OES bestimmt. Zudem wurden der pH-Wert des Bodens und der Humusgehalt ermittelt, also der Anteil an organischem Kohlenstoff im Boden. Bei Stickstoff und Phosphor besteht die Besonderheit, dass der verwendete Spektralbereich nicht ausreicht um die intensivsten Emissionen dieser Elemente zu beobachten. Aufgrund dieser Umstände wurden verschiedene Methoden der multivariaten Datenanalyse herangezogen um die erhaltenen LIB-Spektren auszuwerten.

Multivariate Datenanalyse an Boden-LIB-Spektren

MVA dient grundsätzlich der Erkennung und Darstellung komplexer Zusammenhänge in großen Datenmengen. Für die Auswertung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurden drei Methoden zur Vorhersage ausgewählt: PLSR, LASSO und GPR. Die zugehörigen Merkmale, in diesem Fall verschiedene Bodenparameter, waren durch die an den Bodenproben durchgeführte Referenzanalytik gegeben. Allgemein dienten die Intensitäten der in den LIB-Spektren auftretenden Peaks als Objekte. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Algorithmen der MVA nicht zwischen Peak und Rauschen

unterscheiden, sondern rein mathematische Zusammenhänge zwischen den Punkten eines Spektrums und den Merkmalen suchen. Im vorliegenden Fall konnte das alle 7811 gemessenen Wellenlängen beinhalten. Diese ergaben sich aus der spektralen Auflösung des Gerätes von 100 pm. Die für die Algorithmen verwendeten Merkmale waren die Gesamtgehalte der Nährstoffe im Boden, der pH-Wert, der Humusanteil des Bodens und für einige Nährstoffe der pflanzenverfügbare Gehalt. Die drei verwendeten MVA Methoden unterscheiden sich in der Bearbeitung der Daten.

Da es sich bei PLSR um eine der Standardmethoden der multivariaten Datenanalyse im Bereich der LIBS-Anwendung handelt, wurde diese auch in der vorliegenden Arbeit vorrangig eingesetzt. Sie diente dementsprechend auch als Referenz für die Überprüfung der anderen Methoden bezüglich der Anwendung für die Bodenanalytik.

Die Zuverlässigkeit der Vorhersage ist bei allen verwendeten Methoden abhängig von der Konzentration der Analyten, der Anzahl und Intensität der detektierten Spektrallinien und vorhandenen Matrixeffekte. Dementsprechend hat sich gezeigt, dass für die häufigen Elemente (Ca, Al, Fe, Mg) die Ergebnisse der verschiedenen multivariaten Analysen vergleichbar sind. Unterschiede zeigen sich bei den seltenen Elementen (P, N, Mn) sowie den nicht direkt (mit LIBS) messbaren Parametern (Humusgehalt, pH-Wert, pflanzenverfügbare Nährstoffe). Hier weisen LASSO und GPR bessere Vorhersagen auf als PLSR. Diese Methoden sind weniger auf die primären Linien der jeweiligen Elemente angewiesen. Vielmehr können sie auch indirekte Zusammenhänge erkennen. Das wird besonders bei LASSO deutlich, wenn man die Spektrallinien betrachtet, die in die Vorhersagen eingeflossen sind. Diese gehören nicht oder nur teilweise zu dem gesuchten Element (Ca: 7 von 15; N: keine N-Linie). Die GPR hat sich besonders für die Vorhersage der pflanzenverfügbaren Gehalte und des pH-Wertes als sinnvoll erwiesen.

Datenreduktion

LIBS ermöglicht es, in kurzer Zeit sehr viele Messungen durchzuführen und selbst kleinste Änderungen der Probenoberfläche zu erfassen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen wurden in Form von Rastern durchgeführt. Das heißt, pro Messpunkt wurden 64 Laserschüsse bzw. Spektren auf einer Fläche von 1 mm² aufgenommen (in wenigen Sekunden). Diese hohe Genauigkeit erfordert eine große Anzahl an Messpunkten um repräsentative Ergebnisse zu generieren. Das bedeutet, dass große Datenmengen erzeugt werden, welche für die Anwendung einer Vor-Ort-Analyse hinderlich sein können. Teil der vorliegenden Arbeit war es deshalb, verschiedene Möglichkeiten der Datenreduktion zu testen.

Hierfür wurden drei Herangehensweisen gewählt: ein Ausschlussverfahren zur Eliminierung potentiell fehlerhafter Spektren, Hintergrundkorrektur und Normalisierung der Spektren sowie eine auf dem Signal-Rausch-Verhältnis beruhende Bereinigung der Spektren.

Das Ausschlussverfahren beruht auf einer Hauptkomponentenanalyse und der anschließenden Berechnung des euklidischen Abstandes der Datenpunkte vom Schwerpunkt der ersten drei Hauptkomponenten. Messdaten die sich außerhalb eines festgelegten Abstandes befanden wurden aus dem Datenpool entfernt. Die Hintergrundkorrektur und Normalisierung sind analytische Standardverfahren und wurden hier im Vergleich zu den Rohdaten evaluiert. Die Spektrenbereinigung sollte die Zahl der im Spektrum vorhandenen Datenpunkte reduzieren und wurde hier mittels der frei verfügbaren Software OpenMS durchgeführt.

Alle drei Methoden wurden hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Vorhersagegenauigkeit der oben besprochenen multivariaten Datenanalysen überprüft. Es zeigte sich, dass das Ausschlussverfahren keine eindeutige Änderung bewirkte. Manche Vorhersagen wurden verbessert, andere verschlechtert. Die meisten zeigten keine signifikante Änderung. Die Korrektur und Normalisierung der Spektren ergab für LASSO und GPR größere Änderungen als für PLSR. Insbesondere für LASSO ist diese Vorgehensweise zu empfehlen, da hier eine Verbesserung der Vorhersagen von durchschnittlich 31 % erhalten wurde. Die Spektrenbereinigung zeigte eine deutliche Verringerung der Datenmenge bei gleichzeitigem Erhalt des Informationsgehaltes. Das lässt darauf schließen, dass die meisten im Spektrum vorhandenen Informationen in den sichtbaren Substanzpeaks enthalten sind. Für online-Messungen bedeutet die Bereinigung eine merkliche Einsparung an benötigter Rechenleistung.

LIBS auf Agrarflächen

Die Verwendung der Laser-induzierten Breakdown-Spektroskopie zur Charakterisierung von Bodenparametern hat sich als erfolgreich erwiesen. In Verbindung mit verschiedenen Methoden der multivariaten Datenanalyse konnten zufriedenstellende Vorhersagen getroffen werden. Dies betraf sowohl die absoluten Gehalte diverser Nährstoffe als auch sekundäre Eigenschaften wie den pH-Wert, den Humusgehalt und die Pflanzenverfügbarkeit einzelner Nährstoffe. Die verschiedenen Modelle zeigten dabei teils vergleichbare, teils sehr unterschiedliche Vorhersagen. Für die vorliegende Problemstellung erweist sich eine Kombination aus LASSO und GPR als die sinnvollste Herangehensweise. Die Vermeidung großer Datenmengen und damit die Beschleunigung der Datenauswertung ist am besten durch die Verwendung der beschriebenen Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Bereinigung der Spektren zu erreichen. Eine genaue technische Umsetzung von LIBS im agrarwirtschaftlichen Betrieb ist nicht Bestandteil dieser Arbeit.

4.2. Schimmelpilzkontaminationen

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Getreideuntersuchungen war eine sichere Detektion von Schimmelpilzen. Dies sollte die Grundlage für den Aufbau eines Monitoringsystems für Getreidesilos auf Basis der Ionenmobilitätsspektrometrie bilden. Dabei sollten nicht die Pilze selbst sondern ihre flüchtigen Stoffwechselprodukte detektiert werden. Diese befinden sich im Gasvolumen in und über der Probe, dem sogenannten Headspace. Ihr Auftreten ist von verschiedenen Faktoren abhängig, was im Zuge der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Dazu zählen u.a. die Art des Pilzes und die diesem zur Verfügung stehende Nahrung. Vorrangig war die Suche nach spezifischen Markersubstanzen, anhand derer der Schimmelpilz identifiziert werden kann. Um eine sichere Zuordnung dieser Substanzen zu den korrespondierenden Peaks der entsprechenden IM-Spektren zu gewährleisten, wurde als Referenzmethode die Massenspektrometrie eingesetzt. Diese wurde in der Vergangenheit bereits zur Detektion von Schimmelpilzmetaboliten verwendet. Außerdem existieren hierfür umfangreiche Stoffdatenbanken, welche zur Identifizierung der beobachteten Substanzen herangezogen werden können.

Charakterisierung Detektionsverfahren

Die Korrelation zwischen Ionenmobilitäts- und Massenspektren wurde in zwei Stufen durchgeführt. Zunächst durch einen Wechsel der Ionisationsmethode und anschließend durch die Änderung des Analyseverfahrens. Für die erste Stufe wurde neben dem Referenzgerät ein weiteres Massenspektrometer verwendet. Während das erste mit einer konventionellen Ionisationsquelle auf Basis der Elektronenstoßionisation arbeitete, war das zweite mit einer eigenentwickelten Reaktionskammer für die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck ausgestattet. Dieser APCI-MS-Aufbau diente als Verifizierung der EI-Messungen, da hier für nahezu alle Substanzen die Molmassenpeaks erhalten wurden, welche bei EI nicht immer erkennbar sind. Darüber hinaus stellte es die Schnittstelle für die zweite Korrelationsstufe dar, dem Übergang zwischen MS und IMS. Dies wird dadurch ermöglicht, dass das APCI-IMS eine dem APCI-MS analoge Ionisationsquelle auf Basis weicher Röntgenstrahlung besitzt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass in beiden Geräten die gleichen Ionisationsvorgänge stattfanden.

Die genaue Korrelation erfolgte anhand von Retentionsindices, welche aus den an die jeweiligen Spektrometer gekoppelten Gaschromatographen gewonnen wurden. Hierfür wurde eine Mischung flüchtiger organischer Substanzen (mVOC) verwendet, welche in der Literatur als Schimmelpilzmetabolite bekannt sind. Diese Mischung wurde in vorangehenden Charakterisierungsmessungen verwendet, um verschiedene analytische Parameter der Geräte zu testen und zu vergleichen. Dazu zählten die Nachweisgrenzen und linearen Nachweisbereiche der verschiedenen Substanzklassen. Abgesehen von den jeweiligen molekularen Eigenschaften werden diese Größen durch die jeweilige Ionisationsmethode bestimmt. So können z.B. einige Stoffe bei der APCI aufgrund von Ladungskonkurrenzeffekten während der Reaktionskaskade unterdrückt werden. Andere zeigen bessere LOD als bei EI, weil der selektivere APCI-Mechanismus bei diesen zu einer stärkeren Ionisationsrate führt oder ein günstigeres Signal-Rausch-Verhältnis hervorruft.

In den beschriebenen Voruntersuchungen hat sich gezeigt, dass die Nachweisgrenzen bei den beiden APCI-Aufbauten für die überwiegende Zahl der hier betrachteten Substanzklassen in der gleichen Größenordnung lagen und besser waren als bei EI. Außerdem wurden für alle Substanzen lineare Intensität-Konzentration-Abhängigkeiten über zwei Größenordnungen erhalten. Diese Abhängigkeiten lagen für alle Substanzen in sich überschneidenden Konzentrationsbereichen, womit eine gemeinsame Detektion grundsätzlich möglich ist.

Bei nahezu allen Stoffen konnten in den APCI-Spektren (MS und IMS) sowohl Monomere als auch Dimere der protonierten Molekülonen gefunden werden. Dadurch war eine Verifizierung der EI-Ergebnisse sichergestellt und die Eignung der verwendeten Stoffe als eventuelle interne Standards bei späteren Untersuchungen bestätigt. Durch die zweidimensionale Detektion mit GC und MS bzw. IMS wurden alle Standardsubstanzen deutlich voneinander und von eventuellen Verunreinigungen getrennt und somit sicher identifiziert.

Nährmedium

Zielsetzung der durchgeführten Untersuchungen war die Detektion von Schimmelpilzen in Braugerste. Da diese Matrix sehr komplex und die Verfügbarkeit der darin enthaltenen Nährstoffe inhomogen verteilt ist, wurden zunächst Messungen auf Agar basierten Nährmedien durchgeführt. Damit sollten für diese ersten Messungen reproduzierbare Bedingungen geschaffen werden. Agar ist ein

Galaktose-Polymer, das in Wasser gelöst ein elastisches, mechanisch stabiles Gel bildet, welches durch Synärese einen dünnen Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche erhält. Es dient unter anderem in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel und Gelatineersatz oder in der Medizin als Abführmittel. In der Mikrobiologie wird es als Verfestigung für Nährböden eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Agarsubstrate für die Schimmelpilzkultivierung verwendet, die sich durch die eingebetteten Nährstoffe unterschieden. Dabei handelte es sich um Bierwürze, gemahlene Gerste und eine Mischung aus Gerste und Malz.

Bei den entsprechenden Messungen sollte untersucht werden, inwieweit das Nährmedium die vom Schimmelpilz freigesetzten Metabolite beeinflusst. Hierfür wurden Vertreter aller vier Pilzgattungen jeweils auf den drei Substraten vermessen. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass der größte Teil der mVOC sich nur quantitativ mit dem Medium änderte. Das heißt, die relativen Peakintensitäten in den Substanzmustern der Pilze wurden variiert, aber nahezu alle Stoffe konnten unabhängig vom Agar detektiert werden.

Deutlich signifikanter wirkte sich der Wechsel vom Agar zu den Gerstenkörnern aus. Hier variierten nicht nur die Intensitäten sondern auch das Auftreten verschiedener Substanzen. Insbesondere konnte beobachtet werden, wie sich das Verhältnis zwischen polaren und unpolaren Stoffwechselprodukten änderte.

Dies lässt darauf schließen, dass die Art der vorhandenen Nahrung eine geringere Bedeutung für den Metabolismus der Schimmelpilze hat als die Verfügbarkeit. Während die Nährstoffe im Agar quasi in gelöster Form vorlagen, waren sie in der Gerste in den Zellen bzw. unter den Kornschichten eingeschlossen.

Schimmelpilzmetabolite

Mehr als Siebzig Substanzen konnten im Headspace, also dem Gasvolumen über den kontaminierten Gerste-Proben identifiziert werden. Es handelte sich dabei vorrangig um Vertreter der Stoffklassen der Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester, Aromaten, Terpene und Sesquiterpene. Der größte Teil der Metabolite konnte sowohl mit den beiden MS-Aufbauten als auch mit dem IM-Spektrometer detektiert werden. So wurde zum Beispiel bei der Untersuchung kontaminierter Gerste eine Übereinstimmung von 92 % zwischen den beiden APCI-Geräten festgestellt.

Die Kontamination der untersuchten Proben war durch Inokulation von sterilisiertem Nährmedium mit Sporen bekannter Schimmelpilze erzeugt worden. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Verteilung der gefundenen Stoffe für die jeweiligen Pilze auf Gerste, wie sie mit APCI-MS erhalten wurde. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass jeder Pilz ein eigenes Substanzmuster aufwies.

Unter diesen Metaboliten waren sowohl Stoffe, die für den jeweiligen Pilz charakteristisch waren, als auch solche, die von mehreren Pilzen produziert wurden, zu finden. Diese Muster von spezifischen und unspezifischen Markern konnten für die Identifizierung und Unterscheidung der vier Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* und *Alternaria* verwendet werden. Zu beachten ist hierbei, dass diese vier zwar zu den landwirtschaftlich relevantesten Schimmelpilzen gehören, die Vielfalt an Mikroorganismen in einem realen System aber deutlich höher ist. Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit einer mVOC-Datenbank und diversen früheren Arbeiten zu Schimmelpilzen verringerte somit erwartungsgemäß den Anteil an spezifischen Markern. Denn nicht nur weitere Schimmelpilze produzieren ein derartiges Substanzspektrum. Auch bei anderen Mikroorganismen wie zum Beispiel

Bakterien sind derartige Stoffwechselprodukte zu finden. Dennoch konnten die erhaltenen Substanzmuster weiterhin zur Differenzierung der Pilze verwendet werden.

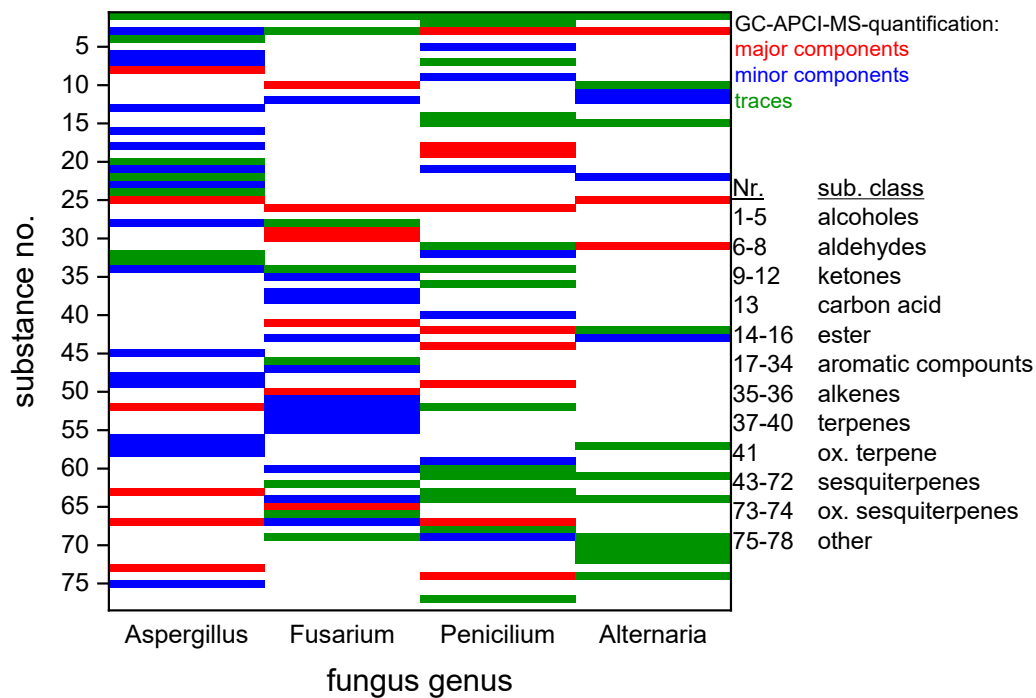


Abb. 5: Übersicht der flüchtigen Schimmelpilzmetabolite im Headspace kontaminierter Gerste-Proben, gemessen mit APCI-MS. Aufgetragen sind die als fortlaufende Nummer codierten Substanzen über den untersuchten Pilzen. Der Farbcode stellt eine semiquantitative Einteilung nach Hauptbestandteilen (rot), Nebenbestandteilen (blau) und Spuren (grün) des Stoffgemisches dar.

In weiterführenden Untersuchungen wurden damit nicht nur Gattungen, sondern auch einzelne Spezies von *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium* unterschieden. Im Zuge dieser Arbeiten erwiesen sich die Stoffgruppen der Aromaten und Sesquiterpene als die wichtigsten für die Identifizierung. Sie stellten gemeinsam den größten Anteil der emittierten Metabolite dar und wiesen mehrheitlich hohe Peakintensitäten auf, was hinsichtlich einer frühzeitigen Detektion in großen Matrixvolumina günstig ist. In Abbildung 5 sind die Intensitäten als farblich markierte semiquantitative Einteilung der Substanzen dargestellt. Die Identifizierung der genauen Spezies der untersuchten Mikroorganismen geht über die einfache Fragestellung der Schimmelpilzdetektion hinaus, zeigt aber das Potential der Ionenmobilitätsspektrometrie. Es eröffnet die Möglichkeit spezifischer Bekämpfungsmaßnahmen und der Übertragung der Methode auf ähnliche Fragestellungen wie z.B. die Ausweitung auf andere Anwendungsgebiete oder die Detektion anderer Mikroorganismen.

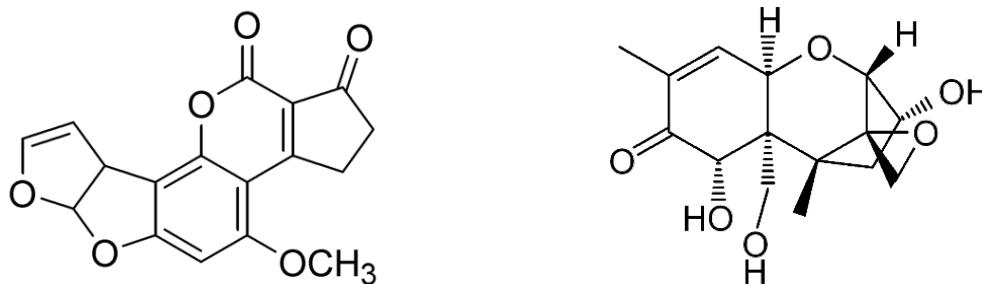
Die vorgestellte Strategie zur Auswertung der durchgeführten Messungen anhand von Einzelsubstanzidentifikationen und Datenbankvergleichen erwies sich als sehr zeitaufwendig. Daher wurden die erhaltenen Spektren zusätzlich mittels multivariater Datenanalyse bearbeitet. Dies sollte zeigen, ob eine Unterscheidung der Pilze ohne genaue Kenntnis des jeweiligen Substanzspektrums möglich sei. Die an den Ergebnissen der Speziesuntersuchungen durchgeführte Hauptkomponentenanalyse erwies sich als erfolgreich. In den erzeugten Score Plots waren die jeweiligen Pilze deutlich voneinander getrennt, und zwei bis drei Hauptkomponenten waren ausreichend um über 70 % der Datenvarianz zu beschreiben. Somit können diese Untersuchungen auch durch eine schnelle

statistische Auswertung bearbeitet werden, was der Zielsetzung einer Vor-Ort-Analytik entgegenkommt. Hierbei erfordert die großtechnische Detektion von Kontaminationen in Getreidesilos jedoch Maßnahmen zur Mobilisierung der flüchtigen Stoffwechselprodukte (z.B. Umwälzung des Gasvolumens) um sicher zu stellen, dass die Analyten in das Spektrometer gelangen.

Mykotoxin-Messungen

Neben den bisher beschriebenen Untersuchungen zur Schimmelpilzdetektion wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit auch Messungen an Mykotoxinen durchgeführt. Mit diesen Versuchen sollte geklärt werden, ob die APCI als Ionisationsmethode bzw. die IMS als analytische Technik für den direkten Nachweis der Schimmelpilzgifte geeignet sind. Da es sich hierbei nur um einzelne Testmessungen handelte, wurden die zugehörigen Ergebnisse bisher nicht veröffentlicht.

Untersucht wurden zwei Substanzen, Aflatoxin B1 (AB1) und Deoxynivalenol (DON). AB1 (Abb. 6 a) wird wie andere Aflatoxine vor allem von den Pilzen der Gattung *Aspergillus* gebildet und gilt unter diesen als das für den Menschen gefährlichste Gift. Seine letale Dosis für einen Erwachsenen liegt zwischen 1 und 10 mg/kg Körpergewicht, und es stellt zudem eine der stärksten krebserzeugenden Verbindungen dar. DON (Abb. 6 b), welches auch unter der Bezeichnung Vomitoxin bekannt ist, wird von den Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildet. Neben seiner Reizwirkung auf den Verdauungstrakt wirkt es auch hemmend auf die Proteinbiosynthese und beeinträchtigt das Immunsystem.



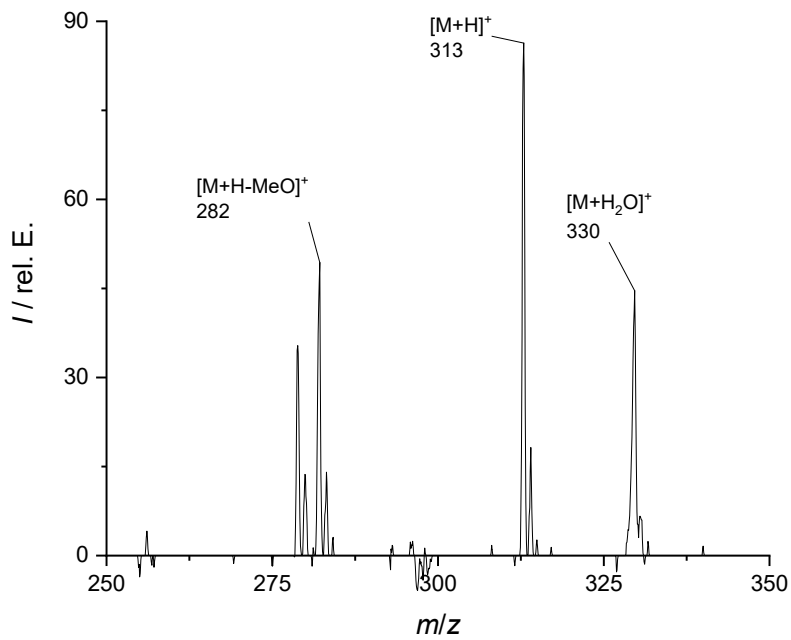
a)

b)

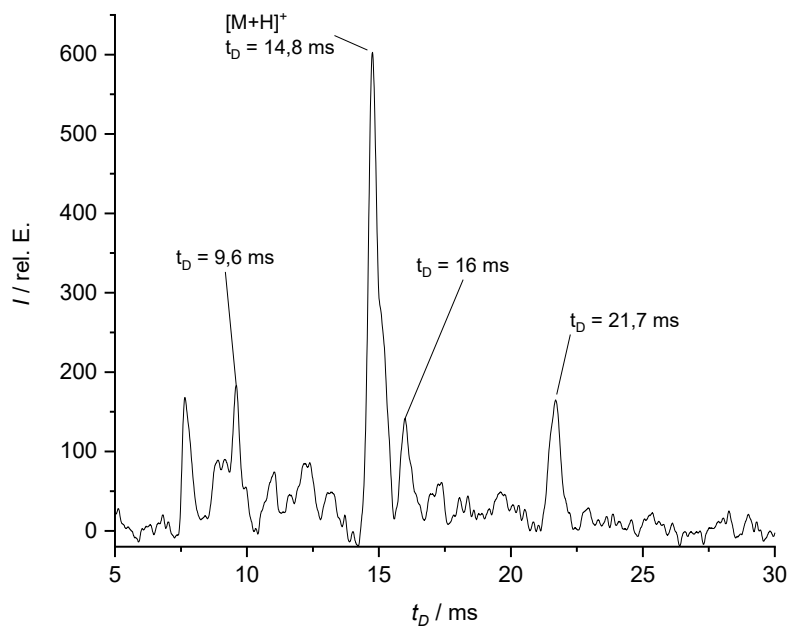
Abb. 6: a) Aflatoxin B1 ($M = 312.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) und Deoxynivalenol ($M = 296.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Stoffe als Lösungen (vornehmlich in Acetonitril) untersucht. Die Messungen fanden mit APCI-MS und APCI-IMS statt, wobei aufgrund der geringen Flüchtigkeit dieser Substanzen auf eine GC-Kopplung verzichtet wurde. Stattdessen wurden die Lösungen in einem vorangeschalteten Thermodesorber verdampft.

In Abbildung 7a ist der relevante Ausschnitt des Massenspektrums von Aflatoxin B1 dargestellt. Zu erkennen sind hier sowohl das protonierte Monomer als auch ein Monomer-Wasser-Addukt. Der dritte Peak zeigt die Abspaltung einer Methoxy-Gruppe. Ein analoges Peakmuster ist auch beim zugehörigen IM-Spektrum (Abb. 7b) zu erkennen. Der dominante Peak bei 14.8 ms entspricht dem protonierten Monomer und die Peaks bei 9.6 und 16 ms den anderen beiden Spezies. Der Peak bei 21.7 ms ist nur bei hohen Konzentrationen zu beobachten und repräsentiert somit wahrscheinlich ein Dimer. Aufgrund einer fehlenden IMMS-Kopplung kann jedoch nicht gesagt werden, aus welchen Bausteinen sich dieses Dimer genau zusammensetzt.



a)



b)

Abb. 7: a) APCI-Massenspektrum von Aflatoxin B1; b) APCI-IM-Spektrum von Aflatoxin B1

Der Nachweis von Aflatoxin B1 in Lösung ist somit per APCI-MS/IMS möglich. Die Nachweisgrenze lag für die MS-Messung bei $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, für die IMS-Messung bei $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Anschließend sollte geprüft werden, ob die Detektion auch in einer komplexen Matrix funktioniert. Dafür wurden die in Gerstenkörnern enthaltenen Substanzen mit Ethanol extrahiert, und dieses

Extrakt mit Aflatoxin versetzt. In Abbildung 8 ist das zugehörige Massenspektrum dargestellt. Man kann erkennen, dass trotz der enthaltenen Substanzvielfalt die zum Mykotoxin gehörenden Peaks identifiziert werden können. Im Vergleich zur Lösung sind die Signalintensitäten hier aufgrund der Ladungskonkurrenz um mindestens 60 % zurückgegangen. Dennoch liegt das Signal-Rausch-Verhältnis im gleichen Bereich wie für die meisten Substanzen, die der Gerste-Matrix zuzuordnen sind. Somit ist der Nachweis des Aflatoxins in einer solchen Matrix grundsätzlich möglich.

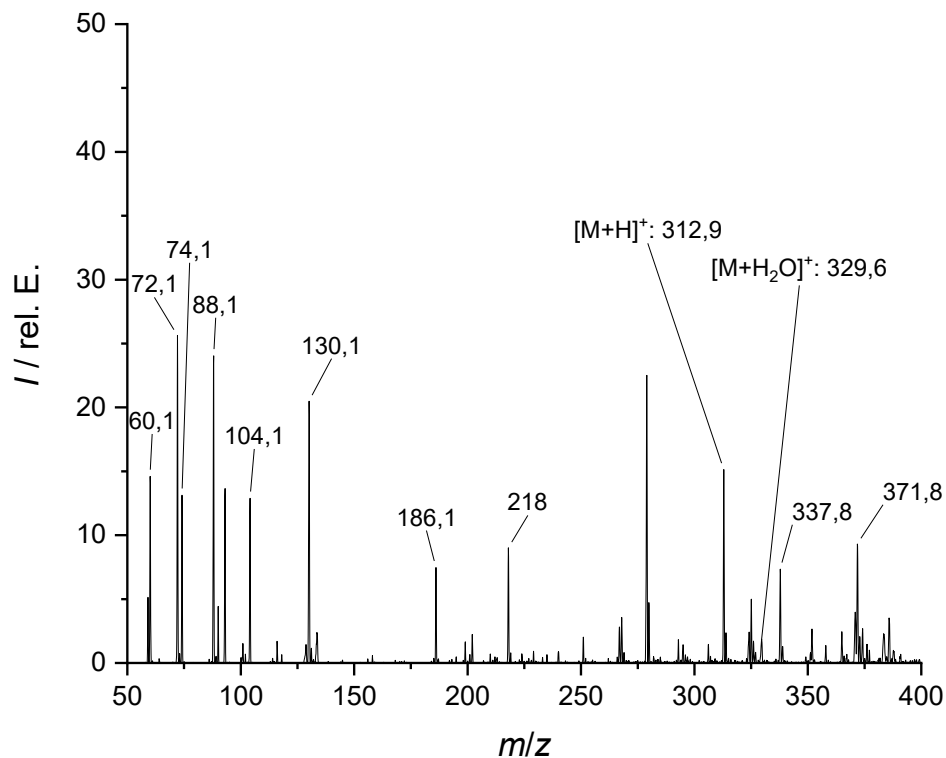


Abb. 8: Massenspektrum eines mit Aflatoxin B1 versetzten Gerste-Extrakts. Benannt sind die Peaks des AB1-Monomers und des zugehörigen Wasser-Addukts. Die nur mit Zahlen markierten Peaks stammen aus der Gerste.

Auch Deoxynivalenol konnte sowohl im APCI-MS als auch im APCI-IMS nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen lagen hier mit $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (MS) und $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}$ (IMS) höher als bei Aflatoxin. Zudem zeigte sich ein deutlicher Memory-Effekt. Bei den Messungen am Massenspektrometer wurden neben dem protonierten Monomer und Dimer noch zwei Fragmente gefunden, welche auf die Abspaltung von Methoxy- und Ethoxy-Gruppen hindeuten. Interessant ist, dass diese Fragmente im IM-Spektrum nicht erkennbar waren. Dennoch hat sich gezeigt, dass auch DON grundsätzlich mit der Ionenmobilitätsspektrometrie detektiert werden kann.

IMS in Lebensmittellagern

Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war die Detektion von Schimmelpilzkontaminationen in Getreideproben. Dies sollte anhand der Charakterisierung flüchtiger Stoffwechselprodukte der Pilze

im Gasvolumen über den Proben erfolgen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Ionenmobilitätsspektrometrie als analytische Methode für diese Fragestellung geeignet ist. Die emittierten Metabolite konnten detektiert und anhand einer Korrelation mit parallel durchgeführten MS-Messungen identifiziert werden. Die Pilze zeigten dabei charakteristische Substanzmuster, welche für ihre Differenzierung verwendet werden konnten. Dies war sowohl für verschiedene Pilzgattungen als auch einzelne Spezies möglich. Die durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss des Nährmediums zeigten, dass die beobachteten Metabolite vor allem von der Verfügbarkeit der Nährstoffe abhängig waren. Weitere Einflussgrößen wie Temperatur, Feuchtigkeitsgehalt, Wachstumsphase oder die Gegenwart anderer Mikroorganismen müssen in künftigen Experimenten untersucht werden. Neben den flüchtigen Stoffwechselprodukten wurden auch einzelne Mykotoxine untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass auch diese mittels der Ionenmobilitätsspektrometrie nachweisbar sind.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die IMS grundsätzlich als Monitoring-System für die Überwachung von Getreide- bzw. Lebensmittellagern genutzt werden kann. Empfehlungen für eine genaue großtechnische Umsetzung sind nicht Bestandteil dieser Arbeit. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die IMS als Analysenmethode das Einbringen der gesuchten Substanzen in das Spektrometer erfordert. Somit ist die Mobilisierung der Analyten Voraussetzung für eine erfolgreiche Detektion.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung nachhaltiger Bewirtschaftungs- und Produktionsmethoden ist eine der zentralen Fragestellungen der modernen Agrarwirtschaft. Gesteigerte Erträge bei gleichzeitigem Erhalt der Ökosysteme erfordern präzise und gezielte eingesetzte Arbeitsmethoden. Die effiziente Ausnutzung der natürlichen Ressourcen setzt unter anderem die Vermeidung von Produktionsverlusten voraus.

Diese Fragestellungen wurden im Zuge der hier vorgestellten Forschungsarbeit untersucht. Der erste Schwerpunkt befasste sich mit der Charakterisierung von Bodenparametern als Informationsgrundlage für den sogenannten Präzisionsackerbau. Der zweite Schwerpunkt behandelte die Detektion von Kontaminationen in Getreidelagern durch Schimmelpilze. Als analytische Techniken wurden hier die Laser-induzierte Breakdown Spektroskopie (LIBS) sowie die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) hinsichtlich ihrer Verwendung in diesen neuen Einsatzgebieten getestet. Zudem wurden für die Verarbeitung der gewonnenen Messergebnisse Methoden der multivariaten Datenanalyse (MVA) genutzt. Alle Methoden wurden daraufhin ausgerichtet prinzipiell eine Vor-Ort-Analytik zu ermöglichen.

Bei der Charakterisierung der Bodenparameter sollten Gesamtgehalte von Makro- und Mikronährstoffen, der pH-Wert, der Humusgehalt und die pflanzenverfügbaren Gehalte einzelner Nährstoffe bestimmt werden. Für alle untersuchten Parameter standen referenzanalytische Daten zur Verfügung, anhand derer die hier durchgeführten Messungen überprüft wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von LIBS mit verschiedenen MVA-Modellen (PLSR, LASSO, GPR) diese Aufgabe erfüllen kann. Die durch LIBS gewonnenen Spektren beinhalten für fast alle Nährstoffe eine ausreichend hohe Zahl und Intensität an Spektrallinien um deren Vorkommen sicher zu detektieren. Die sekundären Parameter weisen Korrelationen zu diesen Elementen auf und konnten durch die multivariate Analyse zuverlässig vorhergesagt werden. Dabei stellte sich heraus, dass für die Makronährstoffe alle MVA-Modelle gleichermaßen gute Ergebnisse liefern. Bei den Mikronährstoffen und sekundären Parametern ist eine Kombination aus LASSO und GPR am besten geeignet. Zudem wurden die Spektren korrigiert und normiert, was insbesondere bei LASSO zu einer signifikanten Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit führte. Die bei LIBS anfallenden sehr großen Datenmengen wurden durch eine Bereinigung der Spektren verringert. Hier zeigte sich ein erheblicher Rückgang der erforderlichen Speicherkapazität bei gleichzeitigem Erhalt der enthaltenen Informationen.

Der Nachweis von Schimmelpilzkontaminationen durch IMS sollte anhand der von den Pilzen produzierten flüchtigen Metaboliten erfolgen. Diese Stoffe, die einer Vielzahl von Substanzklassen zugeordnet werden können, sollten im Headspace der Proben detektiert werden. Als Referenzmethode zur Identifizierung der beobachteten Stoffwechselprodukte wurde die Massenspektrometrie eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die IMS durch Kopplung mit einem Gaschromatographen zur Vortrennung des Stoffgemisches die überwiegende Anzahl der mit MS bestimmten Stoffe detektieren konnte. Die gefundenen mehr als siebzig Substanzen bildeten charakteristische Muster, anhand derer die Pilze voneinander unterschieden werden konnten. Dabei wurden sowohl verschiedene Gattungen als auch einzelne Spezies differenziert. Eine Auswertung der Spektren mittels Hauptkomponentenanalyse zeigte ebenfalls eine eindeutige Zuordnung der verschiedenen Spezies. Somit können diese auch ohne genaue Kenntnis der emittierten Substanzen unterschieden werden. Neben dieser Detektion wurde auch der Einfluss des Nährmediums untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Art der Nährstoffe geringere Änderungen in den Substanzmustern

bedingte als die Verfügbarkeit der Nahrung. Während ersteres lediglich Auswirkungen auf die quantitative Verteilung der Metabolite hatte, führte letzteres zu veränderten Substanzmustern. Als sekundäre Stoffwechselprodukte wurden auch einzelne Mykotoxine untersucht. Diese konnten sowohl mit MS als auch mit IMS erfolgreich nachgewiesen werden, auch in Anwesenheit einer Vielzahl von Hintergrundsignalen, welche von den in der Probe vorhandenen Gerstenkörnern stammten.

Sowohl LIBS als auch IMS wurden erfolgreich auf die jeweiligen Fragestellungen angewendet. Die gesuchten Analyten konnten sicher detektiert, und die sich daraus ergebenden Parameter charakterisiert werden. Beide Techniken können in Form mobiler Handheldgeräte verwendet werden und erlauben eine schnelle Detektion für eine Vielzahl von Substanzen. Die zugehörigen Auswertungen via multivariater Analyse ermöglichen grundsätzlich eine schnelle Verarbeitung der gewonnenen Daten. Somit ist die Eignung beider Methoden für eine Vor-Ort-Analytik gegeben, und sie können prinzipiell als analytische Systeme im Bereich der Agrarwirtschaft eingesetzt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten IMS-Messungen an Headspace-Proben von Braugerste, bei denen sowohl die Detektion als auch die Identifizierung und Differenzierung verschiedener Schimmelpilzspezies im Mittelpunkt standen, sind nach Wissen des Autors bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe durchgeführt worden.

Auch die Verwendung eines Handheld-LIBS zur Nährstoffbestimmung von Bodenproben sowie die Nutzung von LASSO oder Gaußschen Prozessen für die Datenanalyse einer solchen Messung wurden nach Wissen des Autors bisher nicht woanders bearbeitet.

Die vorliegenden Ergebnisse sollten die Grundlage für die Entwicklung nachhaltiger landwirtschaftlicher Methoden darstellen. Im Zuge dessen sollen zukünftige Arbeiten die hier begonnenen Untersuchungen fortsetzen.

Bei der Bodencharakterisierung mit LIBS sollen weitere Parameter wie der Wassergehalt des Bodens oder seine Korngröße untersucht werden. Entsprechende Messungen wurden bereits begonnen, sind aber zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Zudem soll ein Konzept für den Aufbau einer mobilen Sensorplattform erarbeitet werden, welche neben LIBS noch weitere analytische Instrumente enthält. Diese soll für eine genaue Kartierung der Bodeneigenschaften von Agrarflächen eingesetzt werden.

Für die Überwachung von Getreidelagern müssen ebenfalls noch weitere Parameter bestimmt werden. Dazu zählen Feuchtigkeit, Temperatur und konkurrierende Organismen. Darüber hinaus muss eine Übertragung der hier erhaltenen Ergebnisse auf den großtechnischen Maßstab erfolgen. Hier stellt sich insbesondere die Frage, wie die Analyten mobilisiert werden können. Weiterhin würde das hier angedachte IMS-Monitoring eine Form von Frühwarnsystem darstellen. Konkrete Maßnahmen zur Beseitigung einer gefundenen Kontamination müssen anderweitig erarbeitet werden.

I. Literaturverzeichnis

1. UN, U. N. Resolution der Generalversammlung, verabschiedet 25. September 2015. 70/1. Transformation unserer Welt: die Agenda 2030 für nachhaltige Entwicklung. **2018**, 1–38 (2015).
2. Deutsche Bundesregierung. Deutsche Nachhaltigkeitsstrategie. 249 (2016).
3. Federal Ministry for Food and Agriculture. Zukunftsstrategie ökologischer Landbau: impulse für mehr nachhaltigkeit in Deutschland [Strategy of future of organic agriculture: impulse for more sustainability in Germany]. (2019).
4. Amelung, W. *et al.* Scheffer/Schachtschabel Lehrbuch der Bodenkunde. Scheffer/Schachtschabel Lehrbuch der Bodenkunde (2018). doi:10.1007/978-3-662-55871-3.
5. Fontaine, S. *et al.* Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* (2007) doi:10.1038/nature06275.
6. Schmidt, M. W. I. *et al.* Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature10386.
7. Singh, M. *et al.* Stabilization of Soil Organic Carbon as Influenced by Clay Mineralogy. *Advances in Agronomy* vol. 148 (Elsevier Inc., 2018).
8. Gross, C. D. & Harrison, R. B. The Case for Digging Deeper: Soil Organic Carbon Storage, Dynamics, and Controls in Our Changing World. *Soil Syst.* **3**, 28 (2019).
9. ISPA. Precision Ag Definition. <https://www.ispag.org/> (aufgerufen am 07.11.2019) (2019).
10. Ti, J. H. V. T., Peter, G., Mri, M. R. & Jki, J. K. Einschätzung der pflanzlichen Lebensmittelverluste im Bereich der landwirtschaftlichen Urproduktion. (2013).
11. Högermann, C. Schimmelpilze – lebensweise, nutzen, schaden, bekämpfung. Von Ulrich Kück, Minou Nowrousian, Birgit Hoff und Ines Engh. *Biol. Unserer Zeit* (2009) doi:10.1002/biuz.200990075.
12. Bischoff, V. M. & Weser-ems, L. D. L. Mykotoxine im Getreide unter Berücksichtigung der Ernte 1998. 17–37 (1998).
13. Thakur, S. N. & Singh, J. P. Fundamentals of Laser Induced Breakdown Spectroscopy. in *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* (2007). doi:10.1016/B978-044451734-0.50004-1.
14. Li, Y. *et al.* A review of laser-induced breakdown spectroscopy signal enhancement. *Appl. Spectrosc. Rev.* **53**, 1–35 (2018).
15. Pandhija, S., Rai, N. K., Rai, A. K. & Thakur, S. N. Contaminant concentration in environmental samples using LIBS and CF-LIBS. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* (2010) doi:10.1007/s00340-009-3763-x.
16. Hussain, T. & Gondal, M. A. Monitoring and assessment of toxic metals in Gulf War oil spill contaminated soil using laser-induced breakdown spectroscopy. in *Environmental Monitoring and Assessment* (2008). doi:10.1007/s10661-007-9694-2.
17. Gondal, M. A., Hussain, T., Yamani, Z. H. & Baig, M. A. On-line monitoring of remediation process of chromium polluted soil using LIBS. *J. Hazard. Mater.* (2009) doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.127.
18. Death, D. L., Cunningham, A. P. & Pollard, L. J. Multi-element analysis of iron ore pellets by Laser-induced Breakdown Spectroscopy and Principal Components Regression. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* (2008) doi:10.1016/j.sab.2008.04.014.
19. Mansoori, A., Roshanzadeh, B., Khalaji, M. & Tavassoli, S. H. Quantitative analysis of cement powder by laser induced breakdown spectroscopy. *Opt. Lasers Eng.* (2011) doi:10.1016/j.optlaseng.2010.10.005.
20. Ferreira, E. C. *et al.* Determination of Ca in breakfast cereals by laser induced breakdown spectroscopy. *Food Control* (2010) doi:10.1016/j.foodcont.2010.04.004.
21. Schröder, S., Pavlov, S. G., Rauschenbach, I., Jessberger, E. K. & Hübers, H. W. Detection and identification of salts and frozen salt solutions combining laser-induced breakdown spectroscopy and multivariate analysis methods: A study for future martian exploration. *Icarus* (2013) doi:10.1016/j.icarus.2012.11.011.
22. Melikechi, N. *et al.* Correcting for variable laser-target distances of laser-induced breakdown spectroscopy measurements with ChemCam using emission lines of Martian dust spectra. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* (2014) doi:10.1016/j.sab.2014.04.004.
23. Balika, L. *et al.* Laser-induced breakdown spectroscopy in a running hall effect thruster for space propulsion. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* (2012) doi:10.1016/j.sab.2012.06.030.
24. Gross, J. H. *Mass spectrometry: A textbook.* (2004).
25. Eiceman, G. A., Karpas, Z. & Hill, H. H. *Ion mobility spectrometry, third edition. Ion Mobility Spectrometry, Third Edition* (2013).
26. Vautz, W. *et al.* Ion mobility spectrometry for food quality and safety. *Food Addit. Contam.* (2006) doi:10.1080/02652030600889590.

27. Márquez-Sillero, I., Aguilera-Herrador, E., Cárdenas, S. & Valcárcel, M. Ion-mobility spectrometry for environmental analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (2011) doi:10.1016/j.trac.2010.12.007.
28. Baumbach, J. I. Process analysis using ion mobility spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2006) doi:10.1007/s00216-005-3397-8.
29. Krebs, M. D. *et al.* Detection of biological and chemical agents using Differential Mobility Spectrometry (DMS) technology. *IEEE Sens. J.* (2005) doi:10.1109/JSEN.2005.845515.
30. Baumbach, J. I. & Westhoff, M. Ion mobility spectrometry to detect lung cancer and airway. *Lung* (2006).
31. Kanu, A. B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L. & Hill, H. H. Ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* (2008) doi:10.1002/jms.1383.
32. Lanucara, F., Holman, S. W., Gray, C. J. & Evers, C. E. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry* (2014) doi:10.1038/nchem.1889.
33. Maux, D., Enjalbal, C., Martinez, J., Aubagnac, J. L. & Combarieu, R. Static secondary ion mass spectrometry to monitor solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2001) doi:10.1016/S1044-0305(01)00296-3.
34. Beverly, M. B., Voorhees, K. J. & Hadfield, T. L. Direct mass spectrometric analysis of Bacillus spores. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1999) doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19991215)13:23<2320::AID-RCM791>3.0.CO;2-Q.
35. Jones, J. J., Stump, M. J., Fleming, R. C., Lay, J. O. & Wilkins, C. L. Investigation of MALDI-TOF and FT-MS techniques for analysis of Escherichia coli whole cells. *Anal. Chem.* (2003) doi:10.1021/ac026213j.
36. Chouikhi, N. *et al.* CO₂ Adsorption of Materials Synthesized from Clay Minerals: A Review. *Minerals* **9**, 514 (2019).
37. Meunier, A. Why are clay minerals small? *Clay Miner.* **41**, 551–566 (2006).
38. Seneviratne, S. I. *et al.* Investigating soil moisture-climate interactions in a changing climate: A review. *Earth-Science Rev.* **99**, 125–161 (2010).
39. Susha Lekshmi, S. U., Singh, D. N. & Shojaei Baghini, M. A critical review of soil moisture measurement. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **54**, 92–105 (2014).
40. Jeu, R. A. M. *et al.* Global soil moisture patterns observed by space borne microwave radiometers and scatterometers. *Surv. Geophys.* **29**, 399–420 (2008).
41. Tripathi, D. K. *et al.* Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. *Acta Physiol. Plant.* **37**, 1–14 (2015).
42. Miller, A. J. & Cramer, M. D. *Root nitrogen acquisition and assimilation. Plant and Soil* vol. 274 (2005).
43. D. J., M. Fungi and mycotoxins in grains: Implication for stored roducts research. *J. Stored Prod. Res.* **31**, 1–16 (1995).
44. Peraica, M., Radić, B., Lucić, A. & Pavlović, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.* **77**, 754–766 (1999).
45. Brattig, C. B. Produktion von leichtflüchtigen organischen Substanzen (MVOC) durch Schimmelpilze. 93 (2010).
46. Banfalvi, G. Improved and adopted murine models to combat pulmonary aspergillosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 6865–6875 (2018).
47. Bajpai, V. K. *et al.* Invasive Fungal Infections and Their Epidemiology: Measures in the Clinical Scenario. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **24**, 436–444 (2019).
48. Turner, N. W., Subrahmanyam, S. & Piletsky, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* **632**, 168–180 (2009).
49. Cragg, G. M. & Pezzuto, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Med. Princ. Pract.* **25**, 41–59 (2016).
50. Hsu, W. H., Lee, B. H. & Pan, T. M. Red mold dioscorea-induced G2/M arrest and apoptosis in human oral cancer cells. *J. Sci. Food Agric.* **90**, 2709–2715 (2010).
51. De Giacomo, A. & Hermann, J. Laser-induced plasma emission: From atomic to molecular spectra. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **50**, (2017).
52. Babushok, V. I., DeLucia, F. C., Gottfried, J. L., Munson, C. A. & Miziolek, A. W. Double pulse laser ablation and plasma: Laser induced breakdown spectroscopy signal enhancement. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **61**, 999–1014 (2006).
53. Fortov, V. E. & Mintsev, V. B. Extreme states of matter on the Earth and in the cosmos: is there any chemistry beyond the megabar? *Russ. Chem. Rev.* **82**, 597–615 (2013).
54. Firouzi Farrashbandi, N. & Eslami-Kalantari, M. Calculation of the inverse bremsstrahlung absorption in

- unmagnetized plasmas. *Contrib. to Plasma Phys.* 1–5 (2019) doi:10.1002/ctpp.201900054.
55. Aguilera, J. A. & Aragón, C. Characterization of a laser-induced plasma by spatially resolved spectroscopy of neutral atom and ion emissions. Comparison of local and spatially integrated measurements. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **59**, 1861–1876 (2004).
 56. Revercomb, H. E. & Mason, E. A. Theory of Plasma Chromatography/Gaseous Electrophoresis. A Review. *Anal. Chem.* (1975) doi:10.1021/ac60357a043.
 57. Headrick, J. M., Reichardt, T. A., Settersten, T. B., Bambha, R. P. & Kliner, D. A. V. Application of laser photofragmentation-resonance enhanced multiphoton ionization to ion mobility spectrometry. *Appl. Opt.* **49**, 2204–2214 (2010).
 58. Jafari, M. T. & Ramazani, S. Design of an ultrasonic piezoelectric injection port for analysis of thermally unstable compounds using corona discharge ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1038**, 79–86 (2018).
 59. Seyed Khademi, S. M., Telgheder, U., Valadbeigi, Y., Ilbeigi, V. & Tabrizchi, M. Direct detection of glyphosate in drinking water using corona-discharge ion mobility spectrometry: A theoretical and experimental study. *Int. J. Mass Spectrom.* **442**, 29–34 (2019).
 60. Zuhlke, M. *et al.* An electrospray ionization-ion mobility spectrometer as detector for highperformance liquid chromatography. *Eur. J. Mass Spectrom.* **21**, 391–402 (2015).
 61. El-Baba, T. J. & Clemmer, D. E. Solution thermochemistry of concanavalin A tetramer conformers measured by variable-temperature ESI-IMS-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* **443**, 93–100 (2019).
 62. Leyva, D. *et al.* Understanding the structural complexity of dissolved organic matter: Isomeric diversity. *Faraday Discuss.* **218**, 431–440 (2019).
 63. Nachtigall, F. M., Rojas, M. & Santos, L. S. MALDI coupled to modified traveling wave ion mobility mass spectrometry for fast enantiomeric determination. *J. Mass Spectrom.* **53**, 693–699 (2018).
 64. Villatoro, J. *et al.* IR-MALDI ion mobility spectrometry: physical source characterization and application as HPLC detector. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* **19**, 197–207 (2016).
 65. Gillig, K. J. *et al.* Coupling high-pressure MALDI with ion mobility/orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 3965–3971 (2000).
 66. Waraksa, E. *et al.* Dopants and gas modifiers in ion mobility spectrometry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **82**, 237–249 (2016).
 67. Zhang, X., Quinn, K., Cruickshank-Quinn, C., Reisdorph, R. & Reisdorph, N. The application of ion mobility mass spectrometry to metabolomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **42**, 60–66 (2018).
 68. V. Ruzsanyi, J. I. B. Detection of the mold markers using ion mobility spectrometry. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* (2003).
 69. Ruzsanyi, V., Sielemann, S. & Baumbach, J. I. Determination of microbial volatile organic compounds (MVOC) using IMS with different ionisation sources. *Int. J. Ion Mobil. Spectrosc.* (2002).
 70. Räsänen, R. M., Håkansson, M. & Viljanen, M. Differentiation of air samples with and without microbial volatile organic compounds by aspiration ion mobility spectrometry and semiconductor sensors. *Build. Environ.* **45**, 2184–2191 (2010).
 71. Hübert, T., Tiebe, C. & Stephan, I. Detection of fungal infestations of wood by ion mobility spectrometry. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **65**, 675–681 (2011).
 72. Tiebe, C., Miessner, H., Koch, B. & Hübert, T. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by ion-mobility spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 2313–2323 (2009).
 73. Vautz, W. *et al.* Ion mobility spectrometry for food quality and safety. *Food Addit. Contam.* **23**, 1064–1073 (2006).
 74. Sheibani, A., Tabrizchi, M. & Ghaziaskar, H. S. Determination of aflatoxins B1 and B2 using ion mobility spectrometry. *Talanta* (2008) doi:10.1016/j.talanta.2007.11.006.
 75. Khalesi, M., Sheikh-Zeinoddin, M. & Tabrizchi, M. Determination of ochratoxin A in licorice root using inverse ion mobility spectrometry. *Talanta* (2011) doi:10.1016/j.talanta.2010.11.004.
 76. McCooeye, M., Kolakowski, B., Boison, J. & Mester, Z. Evaluation of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry mass spectrometry for the analysis of the mycotoxin zearalenone. *Anal. Chim. Acta* (2008) doi:10.1016/j.aca.2008.05.045.
 77. W. Rödel, G. W. *Grundlagen der Gaschromatographie.* (VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1982).
 78. Sigmaaldrich. Capillary GC Columns, by name. <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=113961356> (abgerufen am 26.11.2019).
 79. Soria, A. C., García-Sarrió, M. J. & Sanz, M. L. Volatile sampling by headspace techniques. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **71**, 85–99 (2015).

80. Mark, T. D. Fundamental aspects of electron impact ionization. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **45**, 125–145 (1982).
81. Haque, A. K. F. *et al.* *Electron Impact Inner-Shell Ionization of Atoms. Advances in Quantum Chemistry* vol. 61 (Elsevier Inc., 2011).
82. Casella, G., Fienberg, S. & Olkin, I. *An Introduction to Statistical Learning. Springer Texts in Statistics* (2013). doi:10.1016/j.peva.2007.06.006.
83. MathWorks. Partial Least Squares. https://de.mathworks.com/help/stats/partial-least-squares.html?searchHighlight=PLS&s_tid=doc_srchtile (aufgerufen am 21.10.2019).
84. Duraipandian, S., Petersen, J. C. & Lassen, M. Authenticity and concentration analysis of extra virgin olive oil using spontaneous raman spectroscopy and multivariate data analysis. *Appl. Sci.* **9**, 1–11 (2019).
85. Zhutovsky, P. *et al.* Individual Prediction of Behavioral Variant Frontotemporal Dementia Development Using Multivariate Pattern Analysis of Magnetic Resonance Imaging Data. *J. Alzheimer's Dis.* **68**, 1229–1241 (2019).
86. Cai, J. R., Yuan, L. M., Liu, B. & Sun, L. Nondestructive gender identification of silkworm cocoons using X-ray imaging with multivariate data analysis. *Anal. Methods* **6**, 7224–7233 (2014).
87. Simon, S., Guthke, R., Kamradt, T. & Frey, O. Multivariate analysis of flow cytometric data using decision trees. *Front. Microbiol.* **3**, 1–13 (2012).
88. MathWorks. Gaussian Process Regression Models. <https://de.mathworks.com/help/stats/gaussian-process-regression-models.html#d117e18829> (aufgerufen am 22.10.2019).
89. Knagg, O. An intuitive guide to Gaussian processes. <https://towardsdatascience.com/an-intuitive-guide-to-gaussian-processes-ec2f0b45c71d> (aufgerufen am 22.10.2019).
90. Bousquet, O., Boucheron, S. & Lugosi, G. *Advanced Lectures on Machine Learning: ML Summer Schools 2003, Canberra, Australia, February 2 - 14, 2003, Tubingen, Germany, August 4 - 16, 2003, Revised Lectures. Advanced Lectures on machine Learning* vol. 3176 (2004).

II. Abbildungsverzeichnis*

Nr.	Bezeichnung	Seite
Abb. 1	Fließschema LIBS-Prozess	8
Abb. 2	Schema eines Driftröhren-IM-Spektrometers	14
Abb. 3	IM-Spektrum (positiver Modus) von 2-Pentanon in Luft	16
Abb. 4	repräsentatives LIB-Spektrum der Bodenprobe einer landwirtschaftlich genutzten Fläche	89
Abb. 5	flüchtige Schimmelpilzmetabolite im Headspace kontaminierter Gerste-Proben	94
Abb. 6	Strukturformeln Alfatoxin B1 und Deoxynivalenol	95
Abb. 7	APCI-Massen-/Ionenmobilitäts-Spektrum von Aflatoxin B1	96
Abb. 8	Massenspektrum eines mit Aflatoxin B1 versetzten Gerste-Extrakts	97
P1 Fig. 1	Representative LIBS spectrum of a soil sample of the field near Wilmersdorf	41
P1 Fig. 2	Results of 10-fold cross validation of Ca data for different multivariate methods	43
P1 Fig. 3	Results of 10-fold PLSR cross validation for Mg and K	44
P1 Fig. 4	Results of 10-fold Lasso cross validation for nitrogen	45
P1 Fig. 5	Results of 10-fold Lasso cross validation for Fe and Mn	45
P1 Fig. 6	Results of 10-fold GPR cross validation for Al	46
P1 Fig. 7	10-fold Lasso cross validation for humus and 10-fold GPR cross validation for pH value	47
P1 Fig. 8	Lasso coefficients for Ca regress	48
P2 Fig. 1	miniature X-ray source and CAD-image of the APCI-chamber	60
P2 Fig. 2	GC-APCI-MS spectra of the mVOC standard	61
P2 Fig. 3	TIC chromatograms of the mVOC standard	62
P2 Fig. 4	Response factors of the components of the mVOC standard relative to 2-phenylethanol	63
P2 Fig. 5	Calibration curves of the mVOC-standard measured with GC-EI-MS and GC-APCI-MS	63
P2 Fig. 6	CID-MS spectrum of caryophyllene	64
P2 Fig. 7	EI/APCI-MS spectra of the mVOC in the headspace above <i>Fusarium culmorum</i>	65
P2 Fig. 8	Heatmap of the mVOC spectra of the four fungus species	65
P2 Fig. 9	Representative sections of the heatmap in Fig. 8	66
P2 Fig. 10	Pie charts representing the frequency distribution of substance classes	67
P2 Fig. 11	Assignment of marker substances found in the headspace to the four fungus genera	68
P2 Fig. 12	Heatmap of mVOC detected by APCI-MS	70
P2 Fig. 13	Assignment of marker substances detected by APCI-MS	70
P3 Fig. 1	2D-spectrum of volatile fungus metabolites and GC-chromatogram of the same mixture	78
P3 Fig. 2	Calibration plots of the mVOC mixture	79
P3 Fig. 3	LOD of eight mVOC for three detection methods	79
P3 Fig. 4	Heatmap of the mVOC detected in the headspace of 4 different genera	80
P3 Fig. 5	Heatmap of the mVOC detected by APCI-MS	81
P3 Fig. 6	Representation of specific and nonspecific metabolites found by APCI-MS	82
P3 Fig. 7	2D spectra of the mVOC from <i>P. Pen 14</i>	82
P3 Fig. 8	Heatmap of the mVOC detected by APCI-IMS	83
P3 Fig. 9	Heatmaps for species detected by APCI-MS and APCI-IMS	84
P3 Fig. 10	Score plot of the PCA of the GC traces (GC-IMS) of the three <i>Aspergillus</i> species	85

* inklusive Publikationen

III. Formelverzeichnis*

Nr.	Beschreibung	Seite
1	Sinkgeschwindigkeit von Partikel in Wasser	4
2	Saha-Boltzmann-Gleichung zur Temperaturbestimmung im Plasma	9
3	Driftgeschwindigkeit	15
4	Reduzierte Mobilität	15
5	Definition Einheit Townsend	15
6	Revercomb-Mason-Gleichung (Ionenmobilität)	15
7	Arbeitsgleichung Ionenmobilität	17
8	Auflösung IMS	17
9, 10	Initialisation APCI	18
11-15	Kaskade zur Kationenbildung APCI	18
16-19	Kaskade zur Anionenbildung APCI	18
20	Auflösung GC	21
21	Retentionsindex	21
22	Prinzip-Gleichung multivariate Datenanalyse	26
23	Linearkombination	27
24	mittlere quadratischer Fehler (MSE) bzw Summe der Abweichungsquadrate (RSS)	28
25	ridge regression	29
26	Bayes-Regel	31
27	Gaußprozess	31

* ohne Publikationen

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
aIMS	Aspirator-IMS
APCI	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
CE	Kapillarelektrophorese
CI	chemische Ionisation
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
cv	Kreuzvalidierung
DESI	Desorptions-Elektrospray-Ionisation
DMA	differentielle Mobilitätsanalysator
EI	Elektronenstoßionisation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	Fast Atom Bombardement
FAIMS	Feld-asymetrische IMS
FI	Feldionisation
GC	Gaschromatographie
GP	Gaußprozess
GPR	ground penetrating radar
GPR	Regression der Gaußschen Prozesse
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HS	Headspace
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
ISPA	International Society of Precision Agriculture
LASSO	least absolute shrinkage and selection operator
LIBS	Laser-induzierte Breakdown Spektroskopie
LK	Linearkombination
LOD	limit of detection
LTQ	Linear-Quadrupol Ionenfalle
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption
MS	Massenspektrometrie
MSE	mittlerer quadratischer Fehler
MVA	multivariate Datenanalyse
NIST	National Institute of Standards and Technology
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PLSR	partial least squares regression
REMPI	resonanzverstärkte Mehrphotonenionisation
RSS	Summe der Abweichungsquadrate
SOC	soil organic carbon
SPME	Festphasenmikroextraktion
spp.	mehrere nicht definierte Spezies einer Gattung
TDR	Time-Domain-Reflectometry
TLC	Dünnschichtchromatographie
ToF	time-of-flight
UV	ultraviolett (Strahlung)
X-ray	Röntgenstrahlung

V. Informationsmaterial

Supplementary Material

Soil nutrient detection for precision agriculture using handheld laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and multivariate regression methods (PLSR, Lasso and GPR)

A. Erler, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben, R. Gebbers

In this supplementary material, the RMSEP of the different soil parameters are provided for the multivariate methods PLSR, Lasso and GPR (Tab. S1). Tab. S1 supplements the coefficients of determination given in Table 2 of the publication.

Tab. S1 Comparison of RMSEP (in ppm, except for humus and pH) of PLSR, Lasso and GPR methods

Parameter	PLSR	LASSO	GPR
Ca	2560	2900	2570
Mg	311	334	313
K	245	258	254
N	162	137	162
P	80.4	76.9	73.7
Fe	1710	1760	1880
Mn	46.9	35.1	49.1
Zn	6.17	7.22	7.23
Al	1110	1220	1050
P (pa)	3.33	3.26	3.04
Humus	0.270	0.238	0.276
pH (Ca)	0.342	0.329	0.264

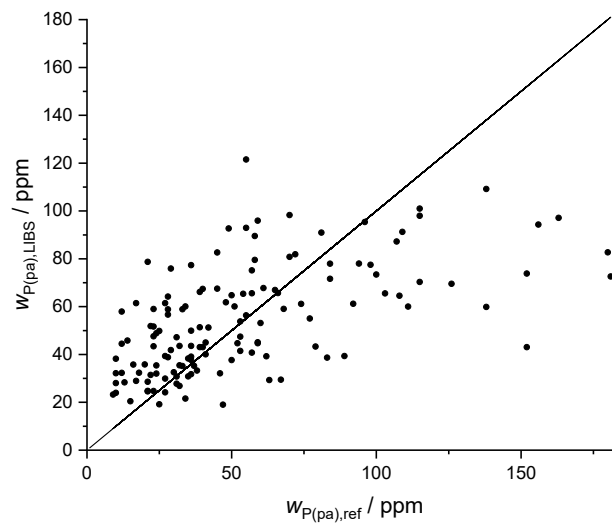


Figure S1. Results of 10-fold GPR cross validation for plant available P, $R^2(P, \text{GPR}) = 0.35$

Supporting Information for

Detection of volatile organic hydrocarbons in the headspace of mold fungi by GC-APCI-MS

A. Erler,¹ D. Riebe,¹ T. Beitz,¹ H.-G. Löhmannsröben,¹ D. Grothusheitkamp,² T. Kunz,² F.-J. Methner²

¹ University of Potsdam, Physical Chemistry, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam

² Technische Universität Berlin, FG Brauwesen, Seestr. 13, 13353 Berlin

Table of contents

1. Supporting Table S1.

Supporting Table S1. Markersubstances found through headspace investigations of mould fungi.

substance class	peak nr.	name
alcohol	1	3-Methyl-1-butanol
	2	1-Octen-3-ol
ketone	3	Cyclohexylcyclohexanone
	4	3-Octanone
	5	Bicyclo[3.2.0]heptan-2-one
	6	2-Nonanone
	7	2-Undecanone
carboxylic acid	8	3-Butylcyclohexanone
	9	2-Methylbutyric acid
ether	10	2,7-Dimethyloxepine
	11	Isomaltol
ester	12	Isobutylacetate
	13	Ethyl-2-methylbutanoate
	14	Ethyl-3-methylbutanoate
	15	Isoamylacetate
	16	Propyl-2-methylbutanoate
	17	Ethyl-2-methylbut-2-enoate
	18	Ethyl-3-methylbut-2-enoate
	19	Ethylhexadecanoate
	aldehyde	20
21		3-Methylbutanaldehyde
22		Xylene
alkylated aromatic compounds	23	Styrene
	24	1-Methyl-2-isopropylbenzene
	25	1-Ethyliden-octahydro-7a-methyl-1H-indene
	26	Benzaldehyde
oxidized aromatic compounds	27	3-Methylanisole
	28	Phenylacetaldehyde
	29	3,5-Dimethylanisole
	30	4-Methylphenol
	31	2-Ethylanisole
	32	2-Phenylethanol
	33	4-Ethylphenol
	34	3-Ethylphenol
	35	Isopropylbenzoate
	36	7-Methyl-1-naphthol
	37	Ethylphenylacetate
	38	3,5-Dimethoxytoluen
	39	4-Ethyl-2-methoxyphenol
	40	Hydroxyphenylurea
	41	2-Purinol
	42	Butylhydroxytoluene
	43	2,3,5,6-Tetramethyl-p-benzoquinone
	44	2-Butyl-3-hexyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin

Supporting Table S1. continuation

substance class	peak nr.	name
alkane	45	Cyclobutane
	46	Methylpentylcyclopropane
alkene	47	2,3-Dimethylpentene
	48	6-Tridecene
conjugated alkene	49	Cyclooctatetraene
terpene	50	α -Phellandrene
	51	2-Methyl-2-bornene
	52	β -Phellandrene
	53	α -Pinene
	54	Carene
	55	Limonene
	56	Terpinene
sesquiterpene	57	Longipinene
	58	β -Patchoulene
	59	γ -Maalien
	60	α -Cedrene
	61	Caryophyllene
	62	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene
	63	Sesquiterpene 1
	64	Valencene
	65	Sesquiterpene 2
	66	Sesquiterpene 3
	67	γ -Muurolene
	68	γ -Cadinene
	69	α -Guaiene
	70	Sesquiterpene 4
	71	(+)-Aromadendrene
	72	Aristolene
	73	Longifolene
	74	10s,11s-Himachala-3(12),4-dien
oxidized sesquiterpene	75	Africanone
	76	Ledol
	77	2-(2-Ethyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetic acid
not identified	78	substance 1
	79	substance 2
	80	substance 3
	81	substance 4
	82	substance 5

Supplementary Material

for the publication “Characterization of volatile metabolites formed by molds on barley by mass and ion mobility spectrometry”

by A. Erler, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben, D. Grothusheitkamp, T. Kunz, F.-J. Methner

This material contains further information about the microbiological volatile organic compounds (mVOC) which are released by the different fungi. This information includes substance names and molecular masses as well as their assignment to the different fungi. Additionally, the citations belonging to the literature comparison are listed here.

Table S1 Overview of microbiological volatile organic compounds (mVOC) found in the headspace of four different fungus genera. This table contains the data visualized in the heatmaps (Fig. 4, 5, 8) and the bar chart (Fig. 6) of the publication. Columns one to four show the classes the substances belong to, the substance number used in the graphics, the substance names along with their molecular masses (M). Superscripted numbers in column three indicate substances already known in the literature (see Table 3 supplementary material and Fig. 6 paper). Columns five to eight show which substances could be detected by which analytical methods for the four different fungi (see Fig. 4 paper). Letters in brackets indicate average peak intensities (h: high, l: low, t: trace) for APCI-measurements (see Fig. 5 and 8 paper).

class	no.	name	M	Aspergillus	Fusarium	Penicillium	Alternaria
Alcohols	1	3-Methylbutanol ^{1,2,3,5,6,9,13}	88	EI/APCI-MS(t)	EI/APCI-MS(t)	EI/APCI-MS(t)	EI/APCI-MS(t); -IMS(l)
	2	1-Hexanol ²⁰	102			EI/APCI-MS(t); -IMS(t)	
	3	1-Octen-3-ol ^{1,2,3,4,8,13,14,15,16}	128	EI/APCI-MS(l); -IMS(l)	EI/APCI-MS(t)	EI/APCI-MS(h); -IMS(t)	EI/APCI-MS(h)
	4	1-Hexanol, 2-ethyl- ²⁰	130	EI/APCI-MS(t); -IMS(h)			
	5	Cyclohexylcyclohexanol	182			EI/APCI-MS(l); -IMS(t)	
Aldehydes	6	Hexanal ^{2,4,7,20}	100	EI/APCI-MS(l)			
	7	Benzaldehyd ^{1,2,4,6,20}	106	EI/APCI-MS(l); -IMS(l)		APCI-MS(t); -IMS(t)	
	8	Nonanal ²⁰	142	EI/APCI-MS(h); -IMS(t)			

Ketones	9	2-Methyl-2-cyclohexanon	112	EI/APCI-MS(l); - IMS(t)	EI/APCI-MS(l); - IMS(t)
	10	3-Octanon ^{1,3,4,5,6,13,14,15}	128	EI/APCI-MS(h); - IMS(l)	EI/APCI-MS(t); -IMS(t)
	11	2-Nonanon ²⁰	142		EI/APCI-MS(l); -IMS(t)
	12	2-Undecanon ^{4,8,20}	170	EI/APCI-MS(l); - IMS(t)	EI/APCI-MS(l); -IMS(l)
Carboxylic acids	13	Nonanoic acid ^{7,8}	158	EI/APCI-MS(l); - IMS(l)	
Ester	14	Ethyl-2-methylbutanoat ^{9,18,20}	130		EI/APCI-MS(t); - IMS(t)
	15	Isoamylacetat ²⁰	130		EI/APCI-MS(t); - IMS(t)
	16	Methyl pentafluorbenzoate	226	EI/APCI-MS(l); - IMS(t)	
Aromatic compounds	17	Phenol ¹⁵	94	EI-MS	
	18	Styren ^{3,7,13,18,20}	104	EI/APCI-MS(l)	EI/APCI-MS(h); - IMS(l)
	19	p-Kresol ¹⁷	108		EI/APCI-MS(h); - IMS(t)
	20	Acetophenone ²⁰	120	EI/APCI-MS(t); - IMS(h)	
	21	2-Phenylethanol ^{2,4,5,15,20}	122	EI/APCI-MS(l); - IMS(l)	EI/APCI-MS(l); - IMS(l)
	22	Guaiacol	124	EI/APCI-MS(t); - IMS(t)	EI/APCI-MS(l); -IMS(t)
	23	Naphthalene ²⁰	128	EI/APCI-MS(l); - IMS(l)	
	24	Phenol, 2-chloro-	128	EI/APCI-MS(t); - IMS(t)	
	25	1,3-Dimethoxybenzen ²⁰	138	EI/APCI-MS(h); - IMS(h)	EI/APCI-MS(h); -IMS(t)
	26	Pentylfuran ²⁰	138	EI/APCI-MS(h)	EI/APCI-MS(h); - IMS(l)

27	p-Xylene ²⁰	138	EI-MS	
28	2-Methoxy-4-vinylphenol	150	EI/APCI-MS(I)	EI/APCI-MS(t)
29	2-Hydroxyphenyl urea	152		EI/APCI-MS(h); - IMS(I)
30	4-Ethyl-2-methoxyphenol	152		EI/APCI-MS(h); - IMS(I)
31	3,4-Dimethoxystyren ²⁰	164		EI/APCI-MS(t); - IMS(t)
32	4-Ethenyl-1,2-dimethoxybenzen ²⁰	164	EI/APCI-MS(t); - IMS(h)	EI/APCI-MS(I); - IMS(h)
33	Oxime-, methoxy-phenyl ^{8,20}	179	EI/APCI-MS(t); - IMS(I)	EI-MS
34	Butylhydroxytoluen ^{7,20}	220	EI/APCI-MS(I)	EI/APCI-MS(t)
35	1,3,6-Octatrien ²⁰	108		EI/APCI-MS(I)
36	1,2,5,5-Tetramethyl-1,3-cyclopentadien	122		EI/APCI-MS(t)
37	Caren ^{7,18,20}	136		EI/APCI-MS(I)
38	β -Phellandren ³	136		EI/APCI-MS(I); - IMS(h)
39	Neo-allo-ocimene ²⁰	136		EI-MS
40	Terpinolene ²⁰	136		EI/APCI-MS(I); - IMS(t)
41	1,8-Cineol ²⁰	154		EI/APCI-MS(h); - IMS(h)
42	(+)-Aromadendrene ^{3,11,20}	204		EI/APCI-MS(h); - IMS(t)
43	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandren ^{18,20}	204		EI/APCI-MS(I); - IMS(h)
44	(E,Z)-alpha-Farnesene ²⁰	204		EI/APCI-MS(h); - IMS(t)
45	1-Cycloheptene, 1,4-dimethyl-3-(2-methyl-1-propene-1-yl)-4-vinyl-	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)	
46	1-Methyl-5-methylen-8-isopropyl-1,6-cyclodecadien	204		EI/APCI-MS(t); - IMS(t)

47	1S,2S,5R,-1,4,4-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(2,5)]dodec-8(9)-en	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
48	unknown Sesquiterpene 1		APCI-MS(I); - IMS(h)
49	beta-Patchoulen ^{10,20}	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
50	Bicyclogermacren ²⁰	204	EI/APCI-MS(h); - IMS(t)
51	Cadine-1,4-diene	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
52	Caryophyllen ^{3,4,10,15,16,20}	204	EI/APCI-MS(h); - IMS(I)
53	Epizonaren ²⁰	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
54	Germacrene D ^{12,20}	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
55	Isoleden ⁹	204	EI/APCI-MS(I)
56	Ledene ²⁰	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
57	Longifolene ^{7,10,16,20}	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
58	Selina-3,7(11)-dien	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(t)
59	Seychellene	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(t)
60	Thujopsen	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
61	Valencen ²⁰	204	EI/APCI-MS(t); - IMS(t)
62	α -Bisabolen ²⁰	204	EI/APCI-MS(t); - IMS(t)
63	α -Cadinene ¹¹	204	EI/APCI-MS(h); - IMS(I)
64	α -Cedren ^{10,10,12,18}	204	EI/APCI-MS(I); - IMS(I)
			EI/APCI-MS(t); - IMS(t)

65	α -Cubeben ²⁰	204	EI/APCI-MS(h); - IMS(l)
66	α -Elemene ²⁰	204	EI/APCI-MS(t); - IMS(t)
67	α -Longipinen ^{8,20}	204	EI/APCI-MS(h); - IMS(t) EI/APCI-MS(l); - IMS(l)
68	β -Sesquiphellandren ^{3,10,11}	204	EI/APCI-MS(t); - IMS(t)
69	γ -Muurolen ^{3,20}	204	EI/APCI-MS(t); - IMS(t) EI/APCI-MS(l); - IMS(l)
70	unknown Sesquiterpene 2	204	APCI-MS(t); -IMS(l)
71	unknown Sesquiterpene 3	204	APCI-MS(t); -IMS(t)
72	unknown Sesquiterpene 4	204	APCI-MS(t); -IMS(t)
73	Ethanone, 1-(5,6,7,8-tetrahydro-2,8,8-trimethyl-4H-cyclohepta[b]furan-5-yl)-	220	EI/APCI-MS(h); - IMS(t)
74	Ledol ¹⁹	222	EI/APCI-MS(h); - IMS(t)
75	Butyrolactone ²⁰	86	EI/APCI-MS(l)
76	Oxirane, (1-methylbutyl)-	114	EI-MS
77	unbekannte Sub.	114	APCI-MS(t); - IMS(t)
78	Dodecane ²⁰	170	EI-MS

Table S2: Overview of mVOC found in the headspace of nine different fungus species. This table contains the data visualized in the heatmaps in Fig. 9. Column one represents the numbering found in the graphic (see also table 1 above). Columns two to nine show detection of substances by the APCI systems used in this work according to each fungus species (see Fig. 9 paper). Letters in brackets indicate average peak intensity (h: high, l: low, t: trace).

nr.	<i>A. niger</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. ficuum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearium</i>	<i>F. DW14</i>	<i>P. Pen R</i>	<i>P. Pen A</i>	<i>P. Pen 14</i>
1		MS(t)	MS(t)						
2						MS(l), IMS(t)			
3	MS(l), IMS(t)	MS(t), IMS(t)				MS(l), IMS(t)	MS(h), IMS(t)	MS(l), IMS(t)	MS(l), IMS(t)
4	MS(t), IMS(t)	MS(t), IMS(h)	MS(t), IMS(l)						
5									MS(l), IMS(t)
6	MS(l)								
7	MS(l), IMS(l)		MS(l), IMS(t)						MS(t), IMS(t)
8	MS(h), IMS(t)		MS(l), IMS(t)						
9							MS(t), IMS(t)		MS(t), IMS(t)
10				MS(h), IMS(l)					
11									
12				MS(l), IMS(t)					
13	MS(l), IMS(l)								
14						MS(t), IMS(t)			
15						MS(t), IMS(t)			
16	IMS(t)								
17									
18						MS(t), IMS(t)	MS(t), IMS(l)		
19							MS(t), IMS(t)	MS(t), IMS(t)	
20	MS(t), IMS(h)								
21						MS(t), IMS(l)			MS(t), IMS(t)
22	MS(t), IMS(t)								
23	MS(l), IMS(t)	MS(l), IMS(l)	MS(l)						
24			MS(t), IMS(t)						
25		MS(h), IMS(h)							

26		MS(h)	MS(h), IMS(l)	MS(l), IMS(t)	MS(h), IMS(t)
27					
28					
29			MS(h), IMS(l)		
30		MS(h), IMS(l)	MS(l), IMS(l)		
31				MS(t)	MS(l), IMS(t)
32					MS(l), IMS(h)
33	MS(t), IMS(l)				
34					
35	MS(l)	MS(l)	MS(l)		
36				MS(t)	MS(t)
37					
38		MS(l), IMS(h)			
39					
40					MS(t), IMS(t)
41			MS(h), IMS(h)		
42				MS(h)	
43		MS(l), IMS(h)	MS(h), IMS(h)	MS(t), IMS(t)	
44					MS(h), IMS(t)
45		MS(l), IMS(l)			
46				MS(t), IMS(t)	
47		MS(l), IMS(l)			
48		MS(l), IMS(h)			
49		MS(l), IMS(h)		MS(t), IMS(t)	MS(h), IMS(t)
50			MS(h), IMS(t)		
51			MS(l), IMS(l)		
52	MS(h), IMS(t)	MS(l), IMS(l)		MS(t), IMS(t)	MS(t), IMS(l)
53			MS(l), IMS(l)		
54		MS(l), IMS(l)			

55		MS(l)	
56	MS(l), IMS(l)		
57	MS(l), IMS(l)		
58	MS(l), IMS(t)		
59		MS(l), IMS(t)	
60	MS(l), IMS(l)		MS(t), IMS(l)
61		MS(t), IMS(t)	MS(t), IMS(t)
62		MS(t), IMS(t)	
63	MS(h), IMS(l)	MS(l), IMS(l)	MS(l), IMS(t)
64		MS(l), IMS(l)	MS(t), IMS(t)
65		MS(l), IMS(t)	MS(h), IMS(h)
66		MS(t), IMS(t)	
67	MS(h), IMS(t)	MS(l), IMS(l)	MS(t), IMS(l)
68			MS(t), IMS(t)
69		MS(t), IMS(t)	MS(t), IMS(h)
70			
71			
72			
73	MS(l), IMS(t)		
74		MS(t), IMS(t)	MS(t)
75	MS(l)		
76			
77		MS(t), IMS(t)	MS(t)
78			

Table S3 References of microbiological volatile organic compounds (mVOC) which were already detected in the headspace of mold fungi. Numbering matches the superscripted numbers in table 1 column 3 above.

1	Z. JURJEVIC, G. C. RAINS, D. M. WILSON and W. J. LEWIS; Volatile metabolites associated with one aflatoxigenic and one nontoxigenic <i>Aspergillus flavus</i> strain grown on two different substrates; <i>Phytopathol. Mediterr.</i> (2008) 47, 266–271
2	C. P. Costa, D. G. Silva, A. Rudnitskaya, A. Almeida & S. M. Rocha; Shedding light on <i>Aspergillus niger</i> volatile exometabolome; <i>Scientific Reports</i> 6:27441 DOI: 10.1038/srep27441
3	G. FISCHER, R. SCHWALBE, M. MOELLER, R. OSTROWSKI, W. DOTT; SPECIES-SPECIFIC PRODUCTION OF MICROBIAL VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS (MVOC) BY AIRBORNE FUNGI FROM A COMPOST FACILITY; <i>Chemosphere</i> , Vol. 39, No. 5, pp. 795-810. 1999
4	T. Takeuchi, T. Kimura, H. Tanaka, S. Kaneko, S. Ichii, M. Kiuchib and T. Suzuki; Analysis of volatile metabolites emitted by solid-derived fungi using headspace solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry: I. <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Fusarium solani</i> and <i>Penicillium paneum</i> ; <i>Surf. Interface Anal.</i> 2012, 44, 694–698
5	T. Perl, M. Juenger, W. Vautz, J. Nolte, M. Kuhns, M. Borg-von Zepelin, M. Quintel; Detection of characteristic metabolites of <i>Aspergillus fumigatus</i> and <i>Candida</i> species using ion mobility spectrometry – metabolic profiling by volatile organic compounds; <i>Mycoses</i> 54, e828–e837
6	S. Schuchardt, H. Kruse; Quantitative volatile metabolite profiling of common indoor fungi: relevancy for indoor air analysis; <i>Journal of Basic Microbiology</i> 2009, 49, 350–362
7	V. Polizzi, A. Adams", S. V. Malysheva, S. de Saeger, C. van Peteghem, A. Moretti, A. M. Picco, N. de Kimpe; Identification of volatile markers for indoor fungal growth and chemotaxonomic classification of <i>Aspergillus</i> species; <i>Fungal Biology</i> 116 (2012) 941-953
8	T. Sawoszczuk, J. Sygula-Cholewinska , J. M. del Hoyo-Meléndez; Optimizatio no f headspace solid phase microextraction for the analysis of microbial volatile organic compounds emitted by fungi: Application to historical objects; <i>Journal of Chromatography A</i> , 1409 (2015) 30-45
9	E. I. Savelieva, L. K. Gustyleva, E. D. Kessenikh, N. S. Khlebnikova, J. Leffingwell, O, P. Gavrilova, T. Yu. Gagkaeva; Study of the Vapor Phase Over <i>Fusarium Fungi</i> Cultured on Various Substrates; <i>Chem. Biodiversity</i> 2016, 13, 891 – 903
10	E. I. Savelieva, O. P. Gavrilova, T. Yu. Gagkaeva; Using SolidPhase Microextraction Combined with Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Study of the Volatile Products of Biosynthesis Released by Plants and Microorganisms, <i>Journal of Analytical Chemistry</i> , 2014, Vol. 69, No. 7, pp. 609–615
12	J. C.R. Demyttenaere, R. M. Morina, N. de Kimpe, P. Sandra; Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic <i>Fusarium</i> species, <i>Journal of Chromatography A</i> , 1027(2004) 147-154
13	N. Magan, P. Evans; Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection

	of grain spoilage; Journal of Stored Products Research 36 (2000) 319-340
14	G. S. Chitarra, T. Abee, F. M. Rombouts, M. A. Posthumus, J. Dijksterhuis; Germination of <i>Penicillium paneum</i> Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol, a Volatile Self-inhibitor; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May 2004, Vol. 70, No. 5, p. 2823–2829
15	R. Wihlborg, D. Pippitt, R. Marsili; Headspace sorptive extraction and GC-TOFMS for the identification of volatile fungal metabolites; Journal of Microbiological Methods 75 (2008) 244-250
16	T. Nilsson, T.O. Larsen, L. Montanarella, J.O. Madsen; Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by <i>Penicillium</i> species; Journal of Microbiological Methods, 25 (1996) 245-255
17	A.-L. SUNESSON, W. H. J. VAES, C.-A. NILSSON, G. BLOMQUIST, B. ANDERSSON, R. CARLSON; Identification of Volatile Metabolites from Five Fungal Species Cultivated on Two Media; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 1995, Vol. 61, No. 8, p. 2911–2918
18	A. J. de Lucca, S. M. Boué, C. Carter-Wientjes, D. Bhatnagar; Volatile profiles and aflatoxin production by toxigenic and non-toxicogenic isolates of <i>Aspergillus flavus</i> grown on sterile and non-sterile cracked corn; Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2012, Vol 19, No 1, 91-98
19	X. Zhao, J. Wei, Y. Zhou, W. Kong, M. Yang; Quality evaluation of <i>Alpinia oxyphylla</i> after <i>Aspergillus flavus</i> infection for storage conditions optimization; AMB Expr (2017) 7:151 DOI 10.1186/s13568-017-0450-x
20	Marie C Lemfack, Bjoern-Oliver Gohlke, Serge M T Toguem, Saskia Preissner, Birgit Piechulla, Robert Preissner, mVOC 2.0: a database of microbial volatiles, <i>Nucleic Acids Research</i> , Volume 46, Issue D1, 4 January 2018, Pages D1261–D1265

VI. Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben, dafür danken, dass Sie es mir ermöglicht haben, meine Dissertation in der physikalischen Chemie der Universität Potsdam zu schreiben. Dies umfasst sowohl Ihren umfangreichen Beitrag zur Diskussion der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse als auch Ihre Tätigkeit als Verhandlungsführer und Organisator der hier bearbeiteten Forschungsprojekte. Ich danke Ihnen dafür, dass Sie diese Arbeit immer voller Leidenschaft unterstützt haben, obwohl die behandelten Themen zum Großteil außerhalb des üblichen Forschungsbereiches Ihrer Arbeitsgruppe, der optischen Spektroskopie, lagen. Natürlich danke ich Ihnen auch für die Erstellung des Gutachtens meiner Arbeit.

Für die Erstellung weiterer Gutachten möchte ich auch Frau Dr. Ursula Telgheder von der Universität Duisburg-Essen und Herrn Prof. Dr. Michael W. Linscheid von der Humbolt-Universität zu Berlin herzlich danken.

An der Universität Potsdam möchte ich besonders dem Arbeitsgruppenteil „Ionenmobilitätsspektrometrie“ um Dr. Toralf Beitz danken. Die richtungsweisende Anleitung und Beratung durch Dr. Beitz und Dr. Daniel Riebe, ebenso wie die tatkräftige Unterstützung durch die Kollegen, insbesondere durch Pia Brinkmann und Dr. Martin Zühlke, haben entscheidend zum erfolgreichen Abschluss der Forschungsarbeiten und damit zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte der Gruppe insbesondere für das angenehme Arbeitsklima und die permanente Hilfsbereitschaft danken, durch die auch die größten Probleme überwunden werden konnten. Toralfs visionärer Ideenreichtum und Daniel scheinbar endloser Wissensschatz haben mich immer wieder angespornt, und durch Pia und Martin habe ich gelernt, wie gute Zusammenarbeit unter Kollegen funktioniert.

Weiterhin möchte ich auch den anderen Kollegen der physikalischen Chemie danken. Die lockere und freundschaftliche Atmosphäre und die unterhaltsamen Gruppenzusammenkünfte haben immer wieder für schöne Abwechslung im Arbeitsalltag gesorgt.

Mein Dank gilt hier im Besonderen dem Leiter der allgemeinen Werkstatt Herr Stefan Kleinschmidt und dem Leiter der Elektronikwerkstatt Herr Gennadiy Ronis. Ohne ihre handwerkliche Unterstützung, insbesondere bei der Modifikation von analytischen Geräten oder Aufbauten, wäre ein Großteil der durchgeführten Experimente so nicht möglich gewesen.

Zum Abschluss möchte ich noch meiner Familie danken, die mich sowohl im Studium als auch während meiner Doktorandenzeit immer unterstützt und stets an mich geglaubt haben. Ihr habt mir geholfen, nie aufzugeben.

Danke an euch alle!

VII. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich versichere, dass diese Arbeit noch nicht an anderer Stelle zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht worden ist.

Potsdam, den 28.01.2020

Alexander Erler