

Identifizierung von Mixed Tropical Hardwood (MTH) in Papier mittels chemotaxonomischer und morphologischer Merkmale

Abschlussbericht zum DBU-Projekt AZ 31759-31

Verfasser:

Dr. habil. Jürgen Odermatt (Projektleiter)
Universität Hamburg - Zentrum Holzwirtschaft
Leuschnerstr. 91b
21031 Hamburg

Dr. Andrea Olbrich
Thünen-Institut für Holzforschung
Leuschnerstr. 91d
21031 Hamburg

Dipl. Holzwirtin Stephanie Helmling
Universität Hamburg - Zentrum Holzwirtschaft
Leuschnerstr. 91d
21031 Hamburg

M.Sc. Alina Wassink
Universität Hamburg - Zentrum Holzwirtschaft
Leuschnerstr. 91b
21031 Hamburg

Projektpartner:

Universität Hamburg Zentrum Holzwirtschaft – chemische Holztechnologie
Hamburg, Dr. habil. J. Odermatt

Thünen-Institut für Holzforschung
Hamburg, Dr. habil. G. Koch und Dr. A. Olbrich

TU Darmstadt Fachgebiet für Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik (PMV)
Darmstadt, Prof. Dr.-Ing. S. Schabel, Dr.-Ing. H.-J. Schaffrath

ISEGA-Forschungsgesellschaft mbH
Aschaffenburg, Dr. R. Derra

EMSAT Services UG
Hamburg, Dr. J. Odermatt

Hamburg im Dezember 2017

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung.....	7
2. Einleitung/Motivation.....	9
3. Zielsetzung.....	11
4. Ergebnisse.....	12
4.1. Materialbeschaffung und Herstellung der Referenzproben (Zellstoffe und Mazerate) - AP 1	12
4.1.1. Erweiterung der Sammlung mit neuen relevanten Gattungen.	13
4.1.2. Proben zur Evaluierung der natürlichen Variabilität auf Gattungsebene	13
4.2. Chemotaxonomie: Optimierung der Probenvorbereitung und Analytik (AP 2).....	15
4.2.1. Probenvorbereitung	15
4.2.1.1. Extraktion mit flüssigem CO ₂	15
4.2.1.2. Extraktion größerer Probenmengen.....	17
4.2.1.3. Vergleich von Extraktionsmethoden sowie unterschiedlichen Techniken zur Probenzerkleinerung	20
4.2.2. Solid Phase Extraction	23
4.2.3. Analytik.....	24
4.2.3.1. TD-GC/MS	24
4.2.3.2. GCxGC	25
4.2.4. Wiederholbarkeit.....	26
4.3. Optimierung der Datenauswertung für chemotaxonomische Untersuchungen (AP 3).....	28
4.3.1. Geeignete Datenbanksoftware.....	28
4.3.2. „Pretreatment“ der Daten.....	28
4.4. Chemotaxonomische Erfassung aller ausgewählten Gattungen (AP 4)	31
4.4.1. Datenbankerstellung	31
4.4.2. Nachweis der Gattung <i>Gonystylus</i> spp.....	33
4.4.2.1. MTH versus <i>Gonystylus</i> spp. (849-1)	33
4.4.2.2. MTH versus <i>Gonystylus</i> spp. (849-3B)	36
4.4.2.3. MTH versus <i>Gonystylus</i> spp. (849-3A).....	37
4.4.2.4. Fazit - MTH versus <i>Gonystylus</i> :.....	39
4.5. Lichtmikroskopische Untersuchung an neu aufgenommenen Arten (AP 5)	41
4.6. Elektronenmikroskopische Untersuchung (FE-SEM) (AP 6)	45
4.7. Evaluierung der natürlichen Variabilität auf Gattungsebene (AP 7)	48

4.7.1.	Chemotaxonomie	48
4.7.1.1.	Rubroshorea	48
4.7.1.2.	Gonystylus spp.....	51
4.7.2.	Anatomie	55
4.8.	Anwendung auf Praxisbeispiele (AP 8)	57
4.8.1.	Lichtmikroskopische Untersuchung der Blindproben	58
4.8.2.	Identifizierung mittels Chemotaxonomie.....	59
4.8.2.1.	Fazit – Identifizierung mittels Chemotaxonomie:	65
5.	Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge	67
5.1.	Öffentlichkeitsarbeit.....	67
5.2.	Veröffentlichungen.....	67
5.3.	Vorträge.....	67
6.	Fazit/Ausblick.....	68
7.	Literaturverzeichnis	70
8.	Anhang.....	74

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: CHROMATOGRAMM DES CO ₂ ,FL-EXTRAKTS VON INDUSTRIELL HERGESTELLTEN MTH-ZELLSTOFFS - UNTERSCHIEDLICH GEMAHLEN.....	16
ABBILDUNG 2: MTH MIT CO ₂ ,FL EXTRAHIERT - UNTERSCHIEDLICH GEMAHLEN - DETAILS	16
ABBILDUNG 3: MTH UNTERSCHIEDLICH GEMAHLEN UND EXTRAHIERT	17
ABBILDUNG 4: MTH UNTERSCHIEDLICH GEMAHLEN UND EXTRAHIERT - DETAILS.....	17
ABBILDUNG 5: VERGLEICH VON MTH- VS. GONYSTYLUS SPP.-EXTRAKTEN - JE 100G ZELLSTOFF EXTRAHIERT.....	19
ABBILDUNG 6: POTENTIELLER MARKER (RT=47.65 MIN) AUS VERGLEICH VON MTH- VS. GONYSTYLUS SPP.-EXTRAKTEN - JE 100G ZELLSTOFF EXTRAHIERT (OCTADECEN (MQ=87)).....	19
ABBILDUNG 7: POTENTIELLER MARKER (RT=69,5 MIN) AUS VERGLEICH VON MTH- VS. GONYSTYLUS SPP.-EXTRAKTEN - JE 100G ZELLSTOFF EXTRAHIERT	20
ABBILDUNG 8: BUMETRIZOL	20
ABBILDUNG 9: AUSSCHNITT AUS DEN CHROMATOGRAMMEN DER EXTRAKTSTOFFFRAKTIONEN NACH SPE VON INDUSTRIELL HERGESTELTEM MTH-ZELLSTOFF	24
ABBILDUNG 10: GCXGC/HRTOF-MESSUNG EINES RUBROSHOREA-ZELLSTOFFEXTRAKTS	26
ABBILDUNG 11: MEHRFACHEXTRAKTION (N=6) DES RUBROSHOREA-ZELLSTOFFS 839-9.....	27
ABBILDUNG 12: MEHRFACHEXTRAKTION (N=6) DES RUBROSHOREA-ZELLSTOFFS 839-9-AUTOSCALED	27
ABBILDUNG 13: AUSSCHNITT AUS DEM CHROMATOGRAMM DES KOOMPASSIA ZELLSTOFFEXTRAKTS.....	30
ABBILDUNG 14: GENERELLES SCHEMA DER DATENBANKERSTELLUNG	31
ABBILDUNG 15: AUSSCHNITT AUS DER MTH-DATENBANK FÜR SORTENREINE ZELLSTOFFEXTRAKTE	32
ABBILDUNG 16: AUSSCHNITT AUS DER MTH-DATENBANK – MIT SUBSTANZEN, DIE NUR IN EINEM REFERENZEXTRAKT VORKOMMEN	33
ABBILDUNG 17: AUSSCHNITT AUS DER MTH-DATENBANK - MIT SUBSTANZEN, DIE IN 2 UND 3 REFERENZEXTRAKTEN VORKOMMEN	33
ABBILDUNG 18: AUSSCHNITT AUS DER MTH-DATENBANK - MIT SUBSTANZEN, DIE IN 10 UND MEHR REFERENZEXTRAKTEN VORKOMMEN	33
ABBILDUNG 19: POTENTIELLER MARKER BEI RT=85,4 MIN FÜR DEN NACHWEIS UND DIE QUANTIFIZIERUNG VON GONYSTYLUS SPP.	34
ABBILDUNG 20: POTENTIELLER MARKER BEI RT=89,25 MIN FÜR DEN NACHWEIS UND DIE QUANTIFIZIERUNG VON GONYSTYLUS SPP.	34
ABBILDUNG 21: POTENTIELLER MARKER BEI RT=92,6 MIN FÜR DEN NACHWEIS UND DIE QUANTIFIZIERUNG VON GONYSTYLUS SPP. SOWIE EINE KALIBRIERKURVE FÜR DEN BEREICH VON 0-100% MASSENANTEIL.....	35
ABBILDUNG 22: POTENTIELLER MARKER BEI RT=92,6 MIN FÜR DEN NACHWEIS UND DIE QUANTIFIZIERUNG VON GONYSTYLUS SPP. SOWIE EINE KALIBRIERKURVE FÜR DEN BEREICH VON 0-10% MASSENANTEIL.....	35
ABBILDUNG 23: MTH MIT UNTERSCHIEDLICHEN GONYSTYLUSANTEILEN – MIT EINER NICHT IDENTIFIZIERTER SUBSTANZ BEI RT=64,7 MIN	37
ABBILDUNG 24: M/Z=98 (ID=9) ZUR QUANTIFIZIERUNG VON GONYSTYLUS SPP. IN MTH – 0-100%	39
ABBILDUNG 25: M/Z=174 (ID=23) UND M/Z=147 (ID=24) ZUR QUANTIFIZIERUNG VON GONYSTYLUS SPP. IN MTH – 0-10%	39
ABBILDUNG 26: BILDTADEL VON GEFÄßELEMENTEN DER HOLZART CASTANOPSIS ARGENTEA	42
ABBILDUNG 27: DARSTELLUNG UND DATENERHEBUNG DER QUANTITATIVEN MERKMALE DURCH VERMESSEN DER LÄNGE UND DES DURCHMESSERS DER GEFÄßELEMENTE SOWIE DER GEFÄßTÜPFELAPERTUR UND DES –HOFS (AM BEISPIEL VON SHOREA SUBG. RUBROSHOREA (LINKE ABBILDUNG) UND CANARIUM CF. LITTORALE (RECHTE ABBILDUNG) ...	43
ABBILDUNG 28: DARSTELLUNG DER REFERENZEN IM „ALTAS OF VESSEL ELEMENTS“ AM BEISPIEL VON PALAQUIUM SP. ...	44
ABBILDUNG 29: ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER GEFÄßELEMENTE VON GONYSTYLUS. LINKS: MAZERAT; RECHTS: ZELLSTOFF	45
ABBILDUNG 30: GEFÄßELEMENTE MIT UNTERSCHIEDLICHEN RÄNDERN DER GEFÄßELEMENTENDDURCHBRECHUNG	46

ABBILDUNG 31: GEFÄßINNENANSICHT MIT OVALER TÜPFELFORM DER GATTUNG DURIO (LINKS), MIT OVALEN TÜPFELN MIT SCHLITZARTIGER, ERWEITERTER APERTUR DER ART ALBIZIA PROCERA (MITTE) UND MIT LAMELLENARTIGER, ERWEITERTER APERTUR DER GATTUNG HERITIERA (RECHTS)	47
ABBILDUNG 32: HERKUNFT DER UNTERSUCHTEN RUBROSHOREAPROBEN.....	48
ABBILDUNG 33: PETROLETHERR EXTRAKT VON RUBROSHOREA - CENTRAL KALIMANTAN (OP49378)	49
ABBILDUNG 34: PC1 VS PC2 AUS PCA – RUBROSHOREA UNTERSCHIEDLICHER HERKÜNFTE.....	50
ABBILDUNG 35: PC1 VS PC5 AUS PCA – RUBROSHOREA UNTERSCHIEDLICHER HERKÜNFTE.....	51
ABBILDUNG 36: PC1 VS. PC2 - UNTERSCHIEDLICHE GONYSTYLUS SPP. PROBEN.....	52
ABBILDUNG 37: LOADINGS FÜR PC1 UND PC2 - UNTERSCHIEDLICHE GONYSTYLUS SPP. PROBEN.....	53
ABBILDUNG 38: PC1 DOMINIERENDE VERBINDUNGEN, S. A. ABBILDUNG 37.....	53
ABBILDUNG 39: PC1 VS PC2 - OHNE DOMINIERENDE VARIABLEN 40/129 UND 43/149.....	54
ABBILDUNG 40: PC1 VS PC2 - OHNE DIE PROBEN 3A UND 3C.....	54
ABBILDUNG 41: LÄNGE UND BREITE DER GEFÄßELEMENTE DER VARIANZPROBEN.....	57
ABBILDUNG 43: SCHEMA DER DATENBANKABFRAGE EINER ZU UNTERSUCHENDEN PROBE	59
ABBILDUNG 44: VERSCHIEDENE VERGLEICHE ZWISCHEN ANALYSEPROBE UND DER IN DER DATENBANK ABGELEGTE REFERENZEN	60
ABBILDUNG 45: ROHDATENVERGLEICH BLINDPROBE A MIT DURIO – EINZELVERBINDUNG BEI CA. 45,3 MIN	62
ABBILDUNG 46: IN DATENBANK ABGELEGTE EINZELVERBINDUNG MIT RI=17680.....	62
ABBILDUNG 47: "MATCH TABLE" DES "REVERSE FIT" FÜR DEN ABGLEICH DER PROBE 1 (OP50135) MIT DEM IN DER MTH- DATENBANK ABGELEGTE DURIO-EXTRAKT.....	64
ABBILDUNG 48: AUSSCHNITT AUS DER "PEAK LIST" NACH ABGLEICH DER PROBE 1 (OP50135) MIT DER MTH-DATENBANK	64
ABBILDUNG 49: DIPTEROCARPUS PEAKMUSTER.....	65
ABBILDUNG 50: APPARATUR ZUR EXTRAKTION VON FESTSTOFFEN MIT FLÜSSIGEM CO ₂	74
ABBILDUNG 51: IONENLISTE FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG VON GONYSTYLUS SPP. IN MTH - KAP. 4.4.2.3, UNTERSUCHUNGSNUMMER: 936	75

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: AUSGEWÄHLTE GATTUNGEN DES VORGÄNGER-PROJEKTS	12
TABELLE 2: AUSGEWÄHLTE, NEU IN DIE UNTERSUCHUNG AUFGENOMMENE GATTUNGEN.....	13
TABELLE 3: PROBEN ZUR EVALUIERUNG DER VARIABILITÄT.....	14
TABELLE 4: ÜBERSICHT ZU AUSGEWÄHLTEN MASSENSPUREN NACH EXTRAKTION VON 100G ZELLSTOFF	18
TABELLE 5: VOR- UND NACHTEILE DER UNTERSUCHTEN METHODEN ZUR PROBENZERKLEINERUNG UND -EXTRAKTION...	21
TABELLE 6: ERGEBNISSE DER VERSCHIEDENEN KOMBINATIONEN AUS PROBENZERKLEINERUNG UND EXTRAKTION.....	22
TABELLE 7: VERGLEICH VERSCHIEDENER PREPROCESSING KOMBINATIONEN, ANGEZEIGT IST DIE ANZAHL DER DETEKTIERTEN PEAKS	29
TABELLE 8: AUSSCHNITT DER AUSWERTETABELLE FÜR UNTERSUCHUNGSABSCHNITT 936	38
TABELLE 9: ERGEBNISTABELLE NACH ABGLEICH DER PROBE 1 (OP50135) MIT DER MTH-DATENBANK - REFERENZPROBEN GEORDNET NACH RSI.....	63
TABELLE 10: MTH GATTUNGEN, DIE ALS ZELLSTOFFE VORLIEGEN, STAND 06.2017	76
TABELLE 11: ECKPUNKTE ZUR HERSTELLUNG DER PRÜFBLÄTTER FÜR DEN BLINDVERSUCH.....	77

Abkürzungsverzeichnis

AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System
ASE	Accelerated Solvent Extraction
atro	absolut trocken
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
EIC	extracted ion chromatogram
FE-SEM	Field emission scanning electron microscope (Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop)
fSI	forward similarity index
EUTR	EU-Holzhandelsverordnung (European Timber Regulation)
GCxGC	zweidimensionale Gaschromatographie
HolzSIG	Holzhandelssicherungsgesetz
HRTOF	high resolution time of flight mass spectrometry
INT SUM	integration-summation parameter
IAWA	International Association of Wood Anatomists
iSI	intercept similarity index
MQ	match quality
MTH	Mixed Tropical Hardwood
m/z	Massenzahl = Massenspur in einem Massenspektrum
PCA	principal component analysis
rSI	reverse similarity index
RT	Retention time
SPE	solid phase extraction
uSI	union similarity index
TD-GC/MS	Thermodesorption-Gaschromatographie/Massenspektroskopie
UCM	undissolved complex mixture

1. Zusammenfassung

Das Ziel des bearbeiteten Projekts ist die Verbesserung der Identifizierung der für die Produktion von Papieren verwendeten Holzarten. Das Projekt unterstützt direkt die Umsetzung der EU-Holzhandelsverordnung (EUTR) und damit die Verhinderung des Handels mit illegal eingeschlagenem Holz. Während die Identifizierung der für die Papierherstellung verwendeten Holzarten der gemäßigten Zone Europas und Nordamerikas schon lange vor dem Projektbeginn etabliert war (Carpenter 1931), wurden in der vorliegenden Untersuchung die Grundlagen geschaffen, auch ausgewählte „mixed tropical hardwoods“, also Laubhölzer, deren natürliche Verbreitungsgebiete in tropischen Regionen liegen, zu ermöglichen.

Erste Grundlagen wurden in dem Vorläuferprojekt (DBU-Projekt AZ-29436) gelegt. Es wurden zwei unterschiedliche Techniken eingesetzt, die Mikroskopie zum Erkennen anatomischer Unterschiede und die Chemotaxonomie, die Unterschiede im Metabolom der Holzfasern ausnutzt. Während die Mikroskopie für die Identifizierung von Massivholz aber auch von Holzfasern etabliert ist, lagen für den chemotaxonomischen Ansatz lediglich wenige, erste Versuche vor.

Die im Vorläuferprojekt begonnene Herstellung von Referenzmaterialien wurde fortgesetzt, sodass jetzt 31 sortenreine, gebleichte Zellstoffe und 38 Mazerate relevanter, asiatischer Hölzer hergestellt und untersucht wurden. Dazu gehört die Gattung *Gonystylus spp.* (Ramin), die nach dem Washingtoner Artenschutzübereinkommen unter besonderem Schutz steht (CITES II).

Ein wichtiges, grundlegendes Ergebnis ist die Erstellung und Veröffentlichung der anatomischen Referenzen in Form des „Atlas of vessel elements“ (Helmling et al. 2018). Neben einführenden Erklärungen zur mikroskopisch-anatomischen Identifizierung von Laubholzfasern an den Gefäßelementen, werden die charakteristischen Strukturmerkmale der einzelnen Gattungen/Untergattungen eingehend beschrieben und mit hervorragenden, mikroskopischen Bildern belegt. Damit wurden die Grundlagen geschaffen, diese Gattungen zu identifizieren.

Durch ergänzende, feinstrukturelle Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden weitere anatomische Merkmale gesucht und gefunden.

Für die Chemotaxonomie musste ein hoher Aufwand im Bereich der Methodenentwicklung geleistet werden. Bei der Probenvorbereitung wurde nach einer günstigen Kombination aus Probenzerkleinerung und Extraktion gesucht. Die Mahlung unter Kryobedingungen und eine anschließende Soxtherm-Extraktion wurden als günstig erachtet. Bei der anschließenden Analytik der Extrakte wurden die Bedingungen der TD-GC/MS an die komplexen Extraktmischungen angepasst. Es zeigte sich, dass das Trennvermögen der 1D-GC in vielen Fällen nicht ausreicht, weshalb zusätzliche Techniken wie Vortrennung mittels SPE und GCxGC-Messungen getestet wurden. Während bei Fragen zur natürlichen Variabilität und Herkunftsfragen multivariate Auswertemethoden zum Einsatz kamen, insbesondere die PCA, wurde für die Identifizierung in Papier ein Datenbankansatz eingesetzt, der hilft, die hohe Anzahl an anfallenden GC/MS-Daten zu bewältigen. Verschiedene Softwarepakete wurden hierfür getestet. Die Software „Openchrom“ wurde als geeignet erachtet. Die Software ist relativ neu und noch unter intensiver Entwicklung.

Als Nebenprojekt wurden verschiedene Ansätze verfolgt, die Gattung *Gonystylus spp.* in industriell hergestelltem MTH zu identifizieren und zu quantifizieren. Dies ist chemotaxonomisch bisher noch nicht zufriedenstellend gelungen.

Ein weiteres, wichtiges Teilprojekt sind erste Untersuchungen zur natürlichen Variabilität. Da für die chemotaxonomischen Untersuchungen mit hohem Aufwand sortenreine Zellstoffe produziert werden mussten,

stand jeweils nur eine Probe als Referenz zur Verfügung. Für die Entwicklung der Methode ist es jedoch unerlässlich die Aussagekraft der ermittelten charakteristischen, chemotaxonomischen Informationen auf ihre Varianz innerhalb der Gattung zu prüfen. In dieser ersten Untersuchung zur natürlichen Variabilität wurden 6 verschiedene Proben der Gattung *Gonystylus spp.* und 14 Proben der *Shorea* Untergattung *Rubroshorea* mikroskopisch und chemotaxonomisch untersucht. Da im Falle der *Rubroshorea*-Proben auch das Herkunftsgebiet bekannt war, konnte auch dieser Aspekt untersucht werden. Während sich die entscheidenden mikroskopischen Merkmale im Falle der *Gonystylus*- und *Rubroshorea*-Proben als stabil erwiesen, wurden deutliche systematische Unterschiede in der Extraktstoffzusammensetzung der untersuchten Proben gefunden, die vielleicht in Zukunft für tiefergehenden Identifizierungen genutzt werden können, die aktuellen Identifizierungen aber erst einmal erschweren.

Abgeschlossen wurde das Projekt mit einem Blindversuch. Der Hochschule München wurden die vorliegenden 31 Referenzzellstoffe zu Verfügung gestellt mit der Aufgabe, 15 Prüfblätter unbekannter Zusammensetzungen herzustellen. Die Zusammensetzungen wurde von den Partnerlaboren der TU Darmstadt und der ISEGA sowie dem TI mittels Mikroskopie auf Basis des Gefäßatlases ermittelt. Auf eine umfassende chemotaxonomische Bestimmung wurde verzichtet, da der Entwicklungsstand der Methodik als noch nicht ausreichend erachtet wurde. Im Rahmen des Blindtest waren 32x15=480 Entscheidungen zu treffen. Es wurde von den drei Instituten eine hervorragende Trefferquote von 74%, 92% und 96% erreicht. Für die im Fokus der Untersuchung stehende Gattung *Gonystylus* und die mikroskopisch-anatomisch ähnlichsten Gattungen *Lophopetalum* und *Durio* wurde eine Quote von 67%, 100% und 100% erzielt. Für das Projekt und insbesondere für den Faseratlas spricht, dass die besten Werte von einem „externen“ Institut erzielt wurden, das in die Herstellung und Untersuchung der Referenzstoffe nicht involviert war, und dem lediglich der Gefäßatlas als Grundlage für die Identifizierungen zur Verfügung stand.

So erfreulich die Mikroskopieergebnisse auch sind, muss berücksichtigt werden, dass in realen Proben größere Variationen, insbesondere durch weitere Holzarten enthalten sein können, für die noch keine Referenzen vorliegen und die auch eine hohe Ähnlichkeit zu z.B. *Gonystylus spp.* aufweisen könnten. Aus diesem Grund und um möglichst gerichtsfeste Aussagen zu erzielen, ist die Entwicklung einer von der Anatomie unabhängigen Methode wie der Chemotaxonomie von großer Bedeutung und sollte zusammen mit der Untersuchung zusätzlicher Referenzmaterialien unbedingt weitergeführt werden.

2. Einleitung/Motivation

Die Bedeutung von Wäldern für die Umwelt ist Thema vieler Veröffentlichungen. So wird die Klimawirkung sehr eindrücklich von Di Lallo et al. 2017 beschrieben: „...Deforestation and forest degradation are the largest anthropogenic sources of CO₂ emissions into the atmosphere“ und „Tropical forests are the cornerstones of climate change mitigation—they sequester more carbon at faster rates than temperate and boreal forests“. Ein anderer wichtiger Umweltaspekt ist der Artenreichtum tropischer Wälder. Insbesondere durch Berichte zu der aktuell höheren Auslöschungsrates im historischen Vergleich, in denen vom 6. Massensterben (mehr als 75% der Arten sind vom Aussterben bedroht) innerhalb der letzten 540 Millionen Jahre der Erdgeschichte geschrieben wird (Barnosky et al. 2011; Mouillot et al. 2013), findet sich das Thema auch in vielen Massenmedien (Stein 2014; Boeing 2017). (Gardner et al. 2009) schreiben, dass das „...Tropical forest ecosystems host at least two-thirds of the Earths terrestrial biodiversity...“ und weiter, dass „...the combined influence of persistently high rates of deforestation and forest degradation (FAO 2006), over-harvesting, invasive species and global environmental change threatens to make tropical forests the epicentre of current and future extinctions“. „The Plant List“, eine Arbeitsliste aller bekannten Pflanzenarten, enthält 350.699 Arten aus 17.020 Gattungen, beziehungsweise 642 Familien (Anonymous 2013). Steege et al. 2016 ordnen beispielsweise dem Amazonasregenwald 11676 Baumarten aus 1225 Gattungen und 140 Familien zu. Folgerichtig wurden auf der 17. Vertragsstaatenkonferenz des Washingtoner Artenschutzabkommens (CITES) im Oktober 2016 weitere wichtige Baumarten in den Annex II bzw. (EU) Anhang B aufgenommen. Ferner gab es für bereits geschützte Holzarten Änderungen in der Fußnotenregelung. (Koch und Haag 2017). War bisher lediglich die Art *Dalbergia nigra* als bedrohte Art gelistet (Anhang A), so wurden bei der jüngsten Konferenz alle 250 Dalbergiaarten in den Anhang B aufgenommen.

Eine zentrale Rolle bei der Umwandlung von Tropenwald und den damit induzierten Umweltwirkungen wird dem illegalen Holzeinschlag zugeordnet. Die Daten von Lawson 2014 in seinem Bericht für „Forest Trends“ belegen das Ausmaß illegaler Entwaldung. Danach erfolgte im Zeitraum von 2000-2012 49% der Umwandlung von tropischen Waldgebieten in Agrarflächen illegal. Infolge dessen ist auch die Nutzung von auf diesen Flächen gewonnenen Holzes illegal. Die Problematik des illegalen Holzeinschlags und die Schutzwürdigkeit der Tropenwälder sind erkannt und spiegeln sich in der Bildung entsprechender Organisationen und Umweltschutzprogrammen auf höchster Ebene wieder. Beispiele sind der Weltrat für biologische Vielfalt (IPBES), das 2005 aus dem Rahmenübereinkommen der Vereinten Nationen über Klimaänderungen (UNFCCC) hervorgegangene REED+-Konzept (Reducing Emissions from Deforestation and forest Degradation), CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) oder dem Aktionsplan FLEGT (Forest Law Enforcement, Governance and Trade).

Der FLEGT-Aktionsplan wird über EU-Verordnungen und das EUTR (europäische Holzhandelssicherungsgesetz) sowie das deutsche Holzhandelssicherungsgesetz in europäisches und nationales Recht umgesetzt. Danach sind die Marktteilnehmer verpflichtet, definierten „Sorgfaltspflichten“ beim Handel mit Holz nachzukommen. Diese Sorgfaltspflichten umfassen insbesondere Angaben zu den zur Herstellung der Produkte verwendeten Holzarten sowie deren Herkunft und sind in einem 25-seitigen Leitfaden näher erläutert (Anonymous 2016b). Problematisch ist die sich aus den Sorgfaltspflichten ergebende Rückverfolgbarkeit (zur Risikobewertung durch Informationen zu den Lieferanten und allgemeine Informationen zu den Hintergründen zur Bewertung der produktspezifischen Informationen) beim Vorliegen sogenannter „komplexer Lieferketten“. Komplexe Lieferketten liegen vor, wenn „Holz mehrerer Arten oder aus mehreren Quellen für das betreffende Erzeugnis verwendet wurde“ und/oder „die Zahl der Verarbeiter und Vermittler zwischen dem Ort des Holzeinschlags und dem Marktteilnehmer hoch ist“ (Anonymous 2016b). Dies ist sehr häufig bei Papierprodukten gegeben, bei denen mit Fasermischungen gearbeitet wird oder bei denen „Mixed tropical hardwood (MTH)“ eingesetzt wird. Zwar

fallen nicht alle Papiererzeugnisse unter das EUTR, aber mit den Verpackungspapieren, wenn sie als eigenständiges Erzeugnis eingeführt wurden, unterliegt eine der großen Sortengruppen aus dem Bereich der Papiererzeugung der EUTR (Anonymous 2016b).

Zudem muss die Bedeutung der Papierproduktion für die Holzverwendung hervorgehoben werden. Mit einer Produktion von ca. 400 Mio. t/J bilden die Papier-, Karton- und Pappenprodukte eine wichtige Produktgruppe in der Forst-Holz-Papier-Kette (Anonymous 2016a). In einer Auswertung der UN Comtrade Daten, um den Holzhandel von und mit China zu beleuchten, wird der Umsatz mit Papierhalb- und Papierfertigwaren mit einem dreimal höheren Wert angegeben als der Umsatz mit Holzhalb- und Holzfertigwaren (Dieter und Jochem 2017). Mit einem Weltmarktanteil von 15% beim Import von Papierhalbwaren und 18% beim Export von Papierfertigwaren ist China der bedeutendste Marktteilnehmer. Da China gleichzeitig wichtiger Handelspartner eines der „hot spots“ des illegalen Holzeinschlags, dem Malayischen Archipels, ist, ergeben sich nach den EUTR erhöhte Anforderungen bei der Risikobewertung beim Inverkehrbringen relevanter Holzzeugnisse.

Um die oben geschilderten Umweltschutzmaßnahmen durchsetzen zu können, werden Methoden benötigt, um auch in den verschiedenen Papiersorten eine Artidentifizierung der für die Herstellung verwendeten Holzarten vornehmen zu können, obwohl diese in einem stark modifizierten Zustand vorliegen. Die Anforderungen an solche Methoden werden durch die Betrachtung der Bedingungen bei der Papier- bzw. Zellstoffherstellung deutlich.

Eine „Statistische Tonne“ Papier besteht aus: Fasern, Füllstoffen, Hilfsstoffen (Kleemann 2006). Die Fasern für die 3000 verschiedenen Papiersorten (Reinhold 2015) werden zu 80-85% aus Holz und zu 20-15% aus Einjahrespflanzen gewonnen. Es werden ca. 200.000.000t Primärfasern pro Jahr für die weltweite Papierproduktion benötigt. Damit gehört Zellstoff zu den mengenmäßig wichtigsten Massengütern. Ca. 20-25% der benötigten Fasern werden mechanisch hergestellt, 75-80% werden in den verschiedenen Zellstoffherstellungsverfahren gewonnen. Das Holz wird zu Hackschnitzeln (Höhe/Breite/Dicke - ca. 30/30/5mm) zerkleinert, um eine möglichst gleichmäßige Penetration mit den Aufschlusschemikalien zu gewährleisten. Diese Chemikalien wirken dann ca. 2h bei 140-170°C und sehr niedrigen oder extrem hohen pH-Werten auf das Holz ein mit dem Ziel, das in Anteilen von 20-35% in den verschiedenen Holzarten vorhandene Lignin möglichst selektiv zu entfernen. Die Mittellamelle, die Schicht zwischen den Holzzellen, wird hierbei aufgelöst, sodass geringe Scherkräfte ausreichen, um den Holzverbund aufzulösen und die einzelnen Holzzellen zu erhalten. Da die Delignifizierung nach dem Holzaufschluss für hochweiße Qualitäten nicht ausreicht, schließt sich nach dem Holzaufschluss in den meisten Fällen eine mehrstufige Bleichsequenz mit unterschiedlichen Bleichchemikalien bei unterschiedlichen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Chemikalienkonzentrationen, Zeit und Konsistenz) an. Über den Zellstoffherstellungsprozess gehen ca. 50% der Holzsubstanz verloren. Nach dieser intensiven Behandlung sind neben den Hauptkomponenten Lignin und Hemicellulosen auch akzessorischen Bestandteile sowie die vorhandene DNA und RNA entfernt, beziehungsweise denaturiert, weshalb Methoden der Gentechnik zur Artidentifizierung entsprechend geringe Chancen unterstellt werden. Erste Extraktionsversuche an gebleichten Zellstoffen zeigten jedoch, dass nicht alle sekundären Pflanzenstoffe entfernt werden und die verbleibenden Extraktstoffe systematische Unterschiede zeigen, die auf die verwendeten Rohstoffe zurückzuführen sind.

Die sichere Identifikation der für die Papierherstellung verwendeten Holzarten ist für den Umwelt- und Artenschutz von großer Bedeutung. Weder Behörden noch Verbraucher können auf den Einsatz problematischer Holzarten im Papier reagieren, solange diese nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden können. Studien im Auftrag

des WWF Deutschland 2010 (Flosdorff et al. 2010) und (Hirschberger et al. 2012) legen nahe, dass Hölzer aus tropischen Naturwäldern für die Herstellung von Druckerzeugnissen, z.B. von Kinderbüchern, eingesetzt werden. Recherchen von Greenpeace International ergaben, dass Tropenhölzer, unter anderem auch CITES geschützte Arten, in Prozessen zur Papier- und Zellstoffproduktion eingesetzt werden. Das Problem wird durch den weltweit zunehmenden Bedarf an Zellstoff für Verpackungsmaterial verschärft. Laut einer Studie des Thünen-Instituts für Forstökonomie wurden im Jahr 2009 zwischen 103 und 284 Millionen Kubikmeter Rohholz illegal eingeschlagen. 7 bis 17 Prozent des gesamten globalen Einschlags stammen aus illegalen Quellen und stellen somit eine erhebliche Größenordnung dar (Dieter et al. 2012).

Die Ermittlung der für die Papierherstellung verwendeten Holzarten ist heute nur durch vergleichende Fasermikroskopie für konventionelle Zellstoffe mit Hilfe von Referenzfasern möglich. Tropische Holzarten konnten mangels Referenzmaterialien und Erfassung ihrer spezifischen Merkmale bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Eine eindeutige Identifikation der Fasern erfordert daher die Bereitstellung von belegtem Referenzmaterial und die Bestimmung geeigneter Identifizierungsmerkmale. Dieses fehlte bislang für MTH-Arten. Verschärft wird die Situation in Zukunft durch die verstärkte Nutzung der sogenannten „lesser known species“. Dadurch wird der Nutzungsdruck auf bisher nicht oder weniger stark von illegaler Holznutzung betroffene Regionen erhöht und es erhöht sich die Anzahl der Holzarten in den verschiedenen Holzprodukten.

3. Zielsetzung

Das Ziel des Projektes ist es, chemische und weitere morphologische Merkmale für die 28 im Vorgängerprojekt untersuchten Gattungen/Subgattungen sowie für 5-10 weitere, als wichtig erachtete Gattungen, herauszuarbeiten und deren Identifizierungspotenzial zu bewerten. Beide Ansätze der Faseridentifizierung, chemisch und morphologisch, sollen verfolgt und kombiniert werden, um zuverlässigere Identifizierungen zu ermöglichen. Dadurch ergeben sich die folgenden Teilziele:

- a) Die Erweiterung der Untersuchungen um 5-10 relevante Gattungen.
- b) Die Verbesserung der Probenvorbereitung, Analytik und Datenauswertung zur möglichst vollständigen Erfassung aller chemotaxonomisch relevanten Informationen, die aus den Zellstoffen extrahiert und für Identifizierungsprozesse zur Verfügung gestellt werden sollen.
- c) Die lichtmikroskopische Untersuchung der weiteren, im Vergleich zu dem Vorläuferprojekt neu aufgenommenen Gattungen und Erfassung morphologischer Merkmale aller Gattungen/Subgattungen im Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (FE-SEM) sowie die methodische Weiterentwicklung der lichtmikroskopischen Faseranalyse mit einer entsprechenden Erweiterung des im Vorgängerprojekt erstellten Faseratlases.
- d) Evaluierung der systematischen Unterschiede zwischen Gattungen unter Berücksichtigung der natürlichen Variabilität innerhalb einer Gattung.

4. Ergebnisse

Die erforderlichen Maßnahmen sind in neun Arbeitspakete untergliedert und wurden von den Projektteilnehmern teils nacheinander, teils parallel bearbeitet. Der erreichte Stand wird im Folgenden dargestellt.

4.1. Materialbeschaffung und Herstellung der Referenzproben (Zellstoffe und Mazerate) - AP 1

Die bereits im Vorgängerprojekt erstellte Sammlung an industrienahe hergestellten, sortenreinen Referenzzellstoffen und –mazeraten (vgl. Tabelle 1) wurde im laufenden Projekt weiter ausgebaut. Neues Probenmaterial wurde zum einen unter dem Aspekt der Erweiterung der Sammlung relevanter Gattungen gesucht und zum anderen für die Evaluierung der natürlichen Variabilität eingesetzt. Für jede Holzprobe wurde die Richtigkeit der Gattung mit Hilfe der herbarbelegten Sammlung des Thünen-Instituts geprüft.

Tabelle 1: Ausgewählte Gattungen des Vorgänger-Projekts

	Gattung	Handelsname	Familie	Mazerat	Zellstoff
1	<i>Acacia</i> spp.	Mangium	Fabaceae	X	X
2	<i>Avicennia</i> spp.	Api Api	Acanthaceae	X	X
3	<i>Calophyllum</i> spp.	Bintangor	Calophyllaceae	X	X
4	<i>Cocos nucifera</i>	Kokospalme	Arecaceae	X	X
5	<i>Dendrocalamus</i> spp.	Bambus	Poaceae	X	X
6	<i>Dipterocarpus</i> spp.	Keruing	Dipterocarpaceae	X	X
7	<i>Durio</i> spp.	Durian	Malvaceae	X	X
8	<i>Eucalyptus</i> spp.	Eukalyptus	Myrtaceae	X	X
9	<i>Gonystylus</i> spp.	Ramin	Thymelaeaceae	X	X
10	<i>Heritiera</i> spp.	Mengkulang	Malvaceae	X	X
11	<i>Intsia</i> spp.	Merbau	Fabaceae	X	X
12	<i>Koompassia</i> spp.	Kempas	Fabaceae	X	X
13	<i>Lophopetalum</i> spp.	Perupok	Celastraceae	X	X
14	<i>Mangifera</i> spp.	Mango	Anacardiaceae	X	X
15	<i>Palaquium</i> spp.	Nyatoh	Sapotaceae	X	X
16	<i>Rhizophora</i> spp.	Rote Mangrove	Rhizophoraceae	X	X
17	<i>Shorea</i> subg. <i>Rubroshorea</i>	Rotes Meranti	Dipterocarpaceae	X	X
18	<i>Shorea</i> subg. <i>Anthoshorea</i>	Weißes Meranti	Dipterocarpaceae	X	X
19	<i>Shorea</i> subg. <i>Shorea</i>	Bangkirai	Dipterocarpaceae	X	X
20	<i>Shorea</i> subg. <i>Richetia</i>	Gelbes Meranti	Dipterocarpaceae	X	X
21	<i>Swintonia</i> spp.	Merpauh	Anacardiaceae	X	X
22	<i>Tetramerista</i> spp.	Punah	Tetrameristaceae	X	X
23	<i>Camposperma</i> sp.	Terentang-Asia	Anacardiaceae	X	
24	<i>Eugenia (Syzygium)</i> sp.	Kelat	Myrtaceae	X	
25	<i>Gluta</i> sp.	Rengas	Anacardiaceae	X	
26	<i>Litsea</i> sp.	Medang	Lauraceae	X	
27	<i>Madhuca</i> sp.	Bitis	Sapotaceae	X	
28	<i>Parashorea</i> sp.	Gerutu	Dipterocarpaceae	X	

4.1.1. Erweiterung der Sammlung mit neuen relevanten Gattungen.

Die Liste der im Vorgänger-Projekt untersuchten Hölzer (Tabelle 1) aus dem südostasiatischen Raum wurde in diesem Projekt um 11 Gattungen erweitert, die ein hohes Potenzial für die Herstellung von Zellstoff und Papier aufweisen (Tabelle 2). Die Auswahl der Hölzer erfolgte aufgrund der großräumigen Verbreitung der Gattungen und dementsprechend guter Beschaffungsmöglichkeiten für die Zellstoffindustrie. Die Hölzer stammen z.T. aus Plantagen (*Hevea brasiliensis*, *Paulownia* spp.) oder sind Nebenprodukte aus Kuppelproduktionen, die als Zellstoff Verwendung finden.

Die Beschaffung des Materials für die Herstellung der Mazerate (Faservereinzelung durch Auflösen des Gewebeverbands) als belegtes Vergleichsmaterial konnte durch die Bereitstellung von Proben aus der herbarbelegten Sammlung des Thünen-Instituts sichergestellt werden. Die Mazerate liegen daher für alle 11 Gattungen vor. Die Materialbeschaffung von weiteren 1-2 kg Holz je Gattung für die chemotaxonomischen Untersuchungen erwies sich jedoch als schwierig. Aufgrund unsachgemäßer Lagerung während des Transports war eine aus Vietnam erhaltene Probe bei Ankunft in Hamburg mikrobiell befallen und ist somit nicht für chemotaxonomische Untersuchungen zu verwenden. Eine weitere von dort erhaltene Probe erwies sich nach der Holzartenbestimmung als eine nicht angeforderte Gattung, wodurch die Probleme einer genauen Bestimmung am Herkunftsort sichtbar werden. Neun Gattungen konnten in ausreichender Menge beschafft und zu Zellstoff verarbeitet werden.

Tabelle 2: Ausgewählte, neu in die Untersuchung aufgenommene Gattungen

	Gattung	Handelsname	Familie	Mazerat	Zellstoff
1	Liquidambar formosana	Red gum	ALTINGIACEAE	X	
2	Canarium spp.	Kedondong	BURSERACEAE	X	X
3	Hevea brasiliensis	Rubberwood	EUPHORBIACEAE	X	X
4	Albizia spp.	White siris, kokko	FABACEAE-MIMOSOIDEAE	X	
5	Castanopsis spp.	Berangan	FAGACEAE	X	X
6	Paulownia spp	Paulownia	PAULOWNIACEAE	X	X
7	Schima spp.	Samak, puspa	THEACEAE	X	X
8	Parashorea spp.	Gerutu	DIPTEROCARPACEAE		X
9	Alniphyllum spp.	Mee Dong	STYRACACEAE	X	X
10	Ilex spp.	Kecemang	AQUIFOLIACEAE	X	X
11	Nyssa spp.	Tupelo, Nyssa	NYSSACEAE	X	X

Das neue Material wurde nach der bewährten Methode mazeriert. Gleichzeitig wurden vollgebleichte Referenzzellstoffe hergestellt, an denen chemotaxonomische und vergleichende morphologische Untersuchungen vorgenommen werden können.

4.1.2. Proben zur Evaluierung der natürlichen Variabilität auf Gattungsebene

Die natürliche Variabilität der chemischen und morphologischen Merkmale innerhalb einer Gattung wurde anhand der Gattungen *Gonystylus* spp. und *Shorea* subg. *Rubroshorea* überprüft. Für diese beiden Gattungen konnten bisher sechs bzw. 14 Proben beschafft werden, vgl. Tabelle 1. Für die *Gonystylus* spp.-Proben liegen uns leider keine genaueren Informationen zur Herkunft vor, sie konnten als Kanteln oder Profilleisten von verschiedenen holzverarbeitenden Betrieben besorgt werden. Die Proben der Subgattung *Rubroshorea* können dagegen einzelnen Regionen Südostasiens zugeordnet werden.

Tabelle 3: Proben zur Evaluierung der Variabilität

Probe	Gattung	Herkunft	gekocht	gebleicht
849-1	Gonystylus spp.	Schreinerei Olbrich	X	X
849-2	Gonystylus spp.	Schreinerei Steffen	X	X
849-3-A	Gonystylus spp.	Schreinerei Ratheiser	X	X
849-3-B	Gonystylus spp.	Schreinerei Ratheiser	X	X
849-3-C	Gonystylus spp.	Schreinerei Ratheiser	X	X
849-3-D	Gonystylus spp.	Schreinerei Ratheiser	X	X
839-1	Rubroshorea	Central Kalimantan	X	X
839-2	Rubroshorea	East Kalimantan	X	X
839-3	Rubroshorea	West Kalimantan	X	X
839-4	Rubroshorea	Mentawai Islands	X	X
839-5	Rubroshorea	Molukken	X	X
839-6	Rubroshorea	West Malaysia	X	X
839-7	Rubroshorea	Sabah	X	X
839-8	Rubroshorea	West Kalimantan	X	X
839-9	Rubroshorea	East Kalimantan	X	X
839-10	Rubroshorea	West Malaysia	X	X
839-11	Rubroshorea	Mentawai Islands	X	X
839-12	Rubroshorea	Sabah	X	X
839-13	Rubroshorea	Molukken	X	X
839-14	Rubroshorea	Central Kalimantan	X	X

4.2. Chemotaxonomie: Optimierung der Probenvorbereitung und Analytik (AP 2)

Chemotaxonomie ist eine Methode zur Klassifizierung von Pflanzen oder anderen Lebewesen anhand chemischer Merkmale. Bei Holz werden dazu vor allem die sogenannten Extraktstoffe genutzt. Diese kommen im Holz in geringeren Mengen vor, als die an Aufbau und Struktur beteiligten Bausteine Cellulose, Hemicellulose und Lignin, sind aber wesentlich vielfältiger in ihren chemischen Strukturen und häufig gattungs- oder artspezifisch.

Bei der Zellstoffproduktion stören Extraktstoffe, sie führen zu Ablagerungen, Verunreinigen, einer schlechteren Qualität und behindern einen störungsfreien Ablauf der Produktion. Daher wird darauf geachtet, sie weitestgehend zu entfernen, wodurch im Zellstoff entsprechend wenige holzstämmige Extraktstoffe für die Chemotaxonomie zur Verfügung stehen. Zellstoffe enthalten also weniger chemische Merkmale, die für Chemotaxonomie genutzt werden können, als unbehandeltes Holz.

4.2.1. Probenvorbereitung

Für eine möglichst vollständige Erfassung aller Extraktstoffe eines Zellstoffes wurde die Probenvorbereitung optimiert. Verschiedene Methoden zur Mahlung und Extraktion wurden kombiniert und verglichen. Wichtige Kriterien zur Bewertung der Methoden waren die Gesamtmenge der Extraktstoffe und die Anzahl der detektierbaren Substanzen. Ein zusätzliches Kriterium war die Praktikabilität der Vorgehensweise, um einen reibungslosen und fehlerresistenten Ablauf bei der Bearbeitung einer größeren Anzahl von Proben sicherzustellen.

4.2.1.1. Extraktion mit flüssigem CO₂

Als Alternative zu ASE-, Soxhlet- und Soxthermextraktionen wurde die Extraktion mit flüssigem CO₂ getestet (Reinhardt 2017). Aussagen wie „Die Verwendung von überkritischen Flüssigkeiten und auch von Flüssigkeiten mit einem Dampfdruck höher als Normaldruck als Extraktionsmittel hat eine neue Dimension in der Trennwissenschaft erschlossen“ oder auch „Wenn es um die Selektivität geht, ist die Flüssig-CO₂-Extraktion jedoch besser geeignet als die Extraktion mit superkritischem CO₂. Darüber hinaus ist die niedrigere Temperatur ein Vorteil für die Trennung von thermisch labilen Materialien“ jeweils von (Naik et al. 1989) waren Anlass, die Eignung dieser Extraktionstechnik auch auf die Extraktion von tropischen Laubholz Zellstoffen anzuwenden (Untersuchungsnummer: 857). Eine mit der Technik verknüpfte Hoffnung war, zusätzliche Marker für die Identifizierung besonders interessanter Holzarten zu finden. Da die kritischen Holzarten im realen Fall in Mischungen von MTH gefunden werden müssen, wurde industriell hergestellter MTH-Zellstoff als Ausgangsmaterial für diese Untersuchung gewählt. Als zusätzliche Varianten wurden verschiedene Mahltechniken verglichen:

1. das Aufluffen des Faserstoffs mit einer Universalmühle
2. das Pulverisieren des Faserstoffs mittels einer Scheibenschwingmühle.

Die in Abbildung 49 dargestellte Extraktionsapparatur wurde für die Untersuchung verwendet. Es handelt sich prinzipiell um eine in einen Metallautoklaven eingebaute Soxhletapparatur.

Die Chromatogramme der mittels CO_{2,fl} gewonnenen Extrakte sind dominiert durch langkettige Fettsäuren (Abbildung 1).

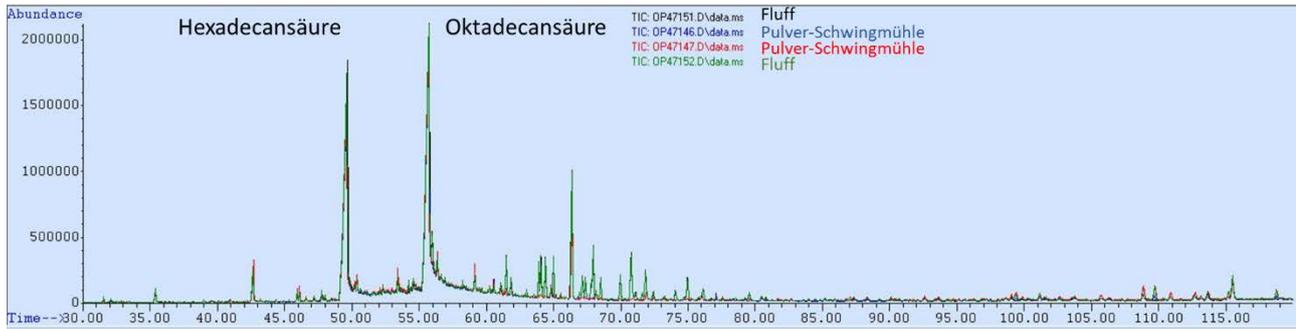


Abbildung 1: Chromatogramm des CO₂,fl-Extrakts von industriell hergestelltem MTH-Zellstoff - unterschiedlich gemahlen

Der Vergleich unterschiedlich gemahlener Zellstoffe zeigt über weite Bereiche des Chromatogramms eine hohe qualitative und quantitative Übereinstimmung. Ein deutlicher Unterschied in Abhängigkeit der Mahlung findet sich im Retentionszeitbereich von ca. 60-80 min. In diesem Bereich eluieren verschiedene Phenylalkylether, teilweise ausschließlich im Falle des aufgeflufften Zellstoffs, zumeist jedoch in wesentlich größerer Menge im Vergleich zu dem zu Pulver gemahlener Zellstoff.

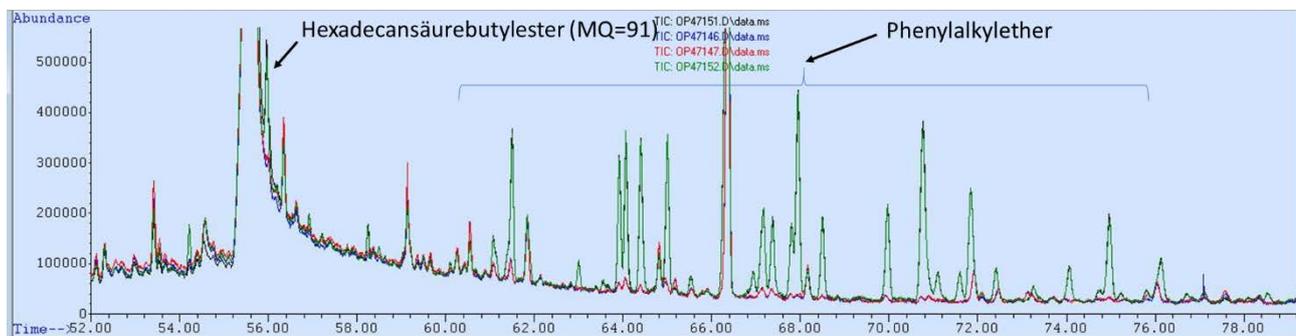


Abbildung 2: MTH mit CO₂,fl extrahiert - unterschiedlich gemahlen - Details

Der Vergleich der mit CO₂,fl gewonnenen Extrakte mit denen aus Soxhlet- und Soxthermextraktionen gewonnenen Extrakte (

Abbildung 3) zeigt weitgehende, qualitative Übereinstimmung. Auffällig sind aber wiederum die Phenylalkyletherverbindungen, die nur in der Kombination „Universalmühle+CO₂,fl-Extraktion“ auftreten. Zwar wurde auch die in OP46954 gemessene MTH-Zellstoffprobe mit der Universalmühle aufgeflufft, dann aber in einem normalen Soxhletextraktor extrahiert. Die Phenylalkylether wurden jedoch nicht in vergleichbarer Menge und Häufigkeit nach normaler Soxhletextraktion gefunden.

Es werden nur in der Kombination „Universalmühle + CO₂,fl“ noch einmal weitere Substanzen aus dem MTH-Zellstoff extrahiert. In einer ersten Bewertung wurden diese Unterschiede jedoch nicht als ausreichend erachtet, den erhöhten Aufwand, den eine CO₂,fl-Extraktion im Vergleich zu den konventionelleren Extraktionen mittels Soxhlet- und Soxthermextraktoren erfordert, zu rechtfertigen. Die CO₂,fl-Extraktion wurde daher im weiteren Verlauf der vorliegenden Untersuchung nicht weiter berücksichtigt.

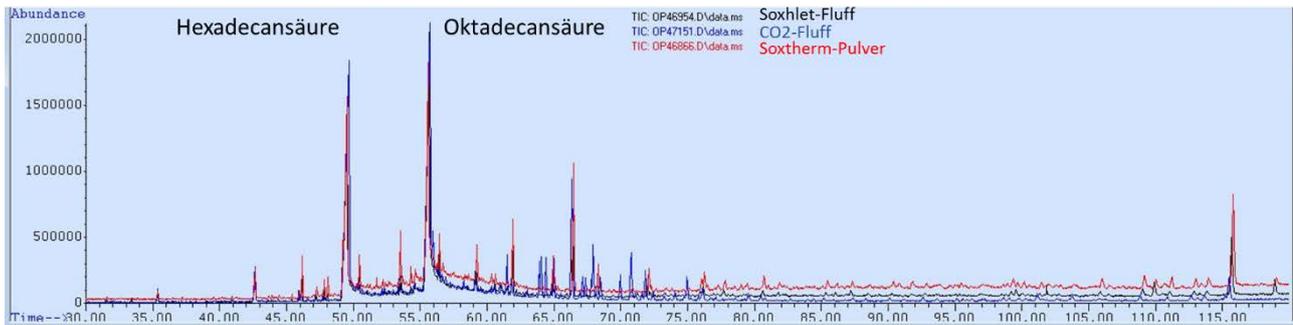


Abbildung 3: MTH unterschiedlich gemahlen und extrahiert

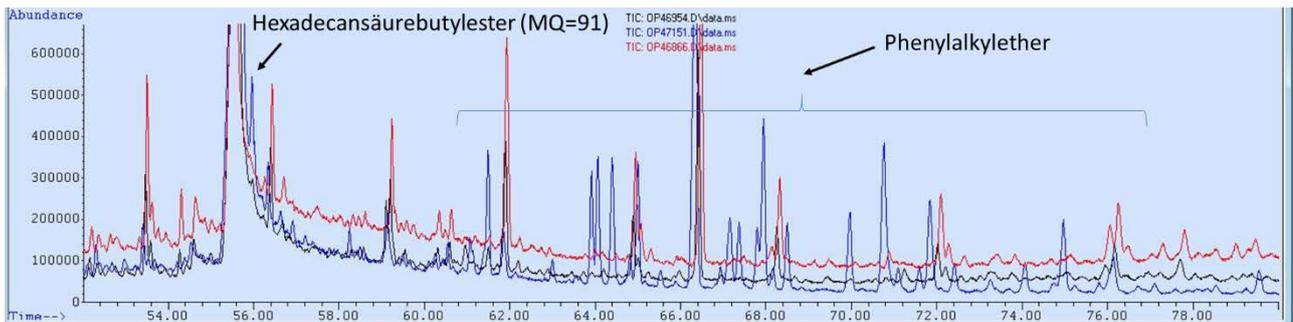


Abbildung 4: MTH unterschiedlich gemahlen und extrahiert - Details

4.2.1.2. Extraktion größerer Probenmengen

Neben der in Kap. 4.2.1.1 beschriebenen Extraktion mit flüssigem CO₂ wurde als weitere Variante im Bereich der Extraktionen die Extraktion mit größeren Probenmengen getestet (Schroettke 2016 - Untersuchungsnummer: 852). Durch die Verwendung eines größeren Soxhletextraktors konnte die extrahierte Zellstoffmenge von 10g auf 100g erhöht werden. Mit der Mengenerhöhung ist beabsichtigt, weitere Holzinhaltsstoffe in den Zellstoffextrakten zu finden, die bei der Extraktion kleinerer Probenmengen unterhalb der Nachweisgrenze bleiben. Damit liegt dieser Untersuchung die gleiche Motivation zugrunde wie im Falle der CO₂-fl-Extraktion, die Erhöhung der Chancen, weitere spezifische Holzinhaltsstoffe zu finden, die als Marker für die Identifizierung eingesetzt werden können. In dieser Teiluntersuchung wurden die Extrakte von sortenreinem, im Labor hergestelltem *Gonystylus spp.*-Zellstoff mit denen von MTH-Zellstoff industrieller Produktion verglichen. Es wurde jeweils eine sukzessive Extraktion mit Petrolether und Aceton durchgeführt. Im visuellen Vergleich der sich ergebenden Chromatogramme wurden 16 potentielle „Marker“ identifiziert, wobei 8 potentielle Marker durch den Vergleich der PE-Extrakte und 8 potentielle Marker durch den Vergleich der Acetonextrakte erhalten wurden.

Tabelle 4: Übersicht zu ausgewählten Massenspuren nach Extraktion von 100 g Zellstoff

Laufnummer	Lösungsmittel	Peak	RT, min	Massenspuren [m/z]
OP45699	Petrolether	1	47.649	111, 125
OP45699	Petrolether	2	57.470	222, 264, 296
OP45699	Petrolether	3	60.228	157, 269, 312
OP45699	Petrolether	4	66.171	139, 153, 165, 179
OP45699	Petrolether	5	66.293	193, 284, 340
OP45699	Petrolether	6	69.496	272, 300, 315
OP45699	Petrolether	7	75.152	294, 320, 337
OP45699	Petrolether	8	86.520	303, 329, 396, (414)
OP45705	Aceton/Wasser 9:1	9	45.280	143, 199, 242
OP45705	Aceton/Wasser 9:1	10	48.757	143, 213, 256
OP45705	Aceton/Wasser 9:1	11	55.016	141, 172, 233
OP45705	Aceton/Wasser 9:1	12	57.269	237, 262, 294
OP45705	Aceton/Wasser 9:1	13	59.114	137, 193, 308
OP45734	Aceton/Wasser 9:1	14	158.290	69, 82, 97
OP45734	Aceton/Wasser 9:1	15	158.765	143, 283, 326
OP45705	Aceton/Wasser 9:1	16-20	≈63.50-82.00	340, 354, 368, 384, 396

Abbildung 5 gibt einen Überblick zu dem Vergleich der aus je 100g gewonnenen Extrakte von MTH- und *Gonystylus spp.*-Zellstoffen (849-2), indem der relevante Chromatogrammausschnitt dargestellt ist. Sehr dominant sind wiederum die C18- und C16-Fettsäuren sowie ein Di-Ester der Hexandisäure. Darüber hinaus fällt der im Vergleich zu MTH bei *Gonystylus spp.* viel stärker ausgeprägte UCM-Hügel von 65 bis 105 min auf. Die Abbildung 6 und die Abbildung 7 zeigen zwei der durch den visuellen Vergleich ermittelten potentiellen Marker-Verbindungen mit Indizierung der sich anbietenden Massenspuren. Diese Massenspuren können für den Aufbau von Kalibrierkurven genutzt werden, wie dies in (Odermatt et al. 2005) beschrieben ist. Mit einer MQ=87 wird die Substanz bei 47,66 min als Octadecen identifiziert. Die Substanz, die bei RT=69,5 min eluiert wird als Bumetrizol (MQ=96) identifiziert, s. Abbildung 8, dass technisch unter dem Namen Tinuvin© bekannt ist und durch seine guten Radikalfängereigenschaften als Additiv zur Alterungsstabilisierung in vielen Produktklassen eingesetzt wird.

Die Marker wurden in einer weiteren Teiluntersuchung auf ihre Eignung zur Identifizierung und Quantifizierung von *Gonystylus spp.* in MTH-Zellstoff untersucht (Helena Burkhardt 2016 - Kap. 4.4.2.2)

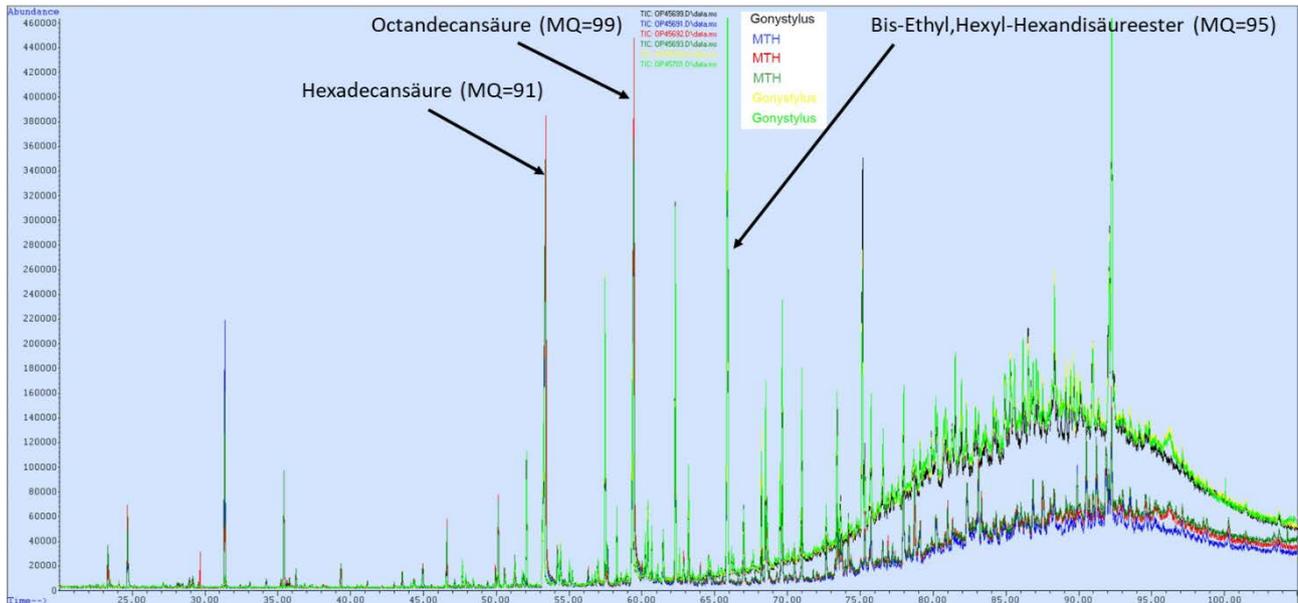


Abbildung 5: Vergleich von MTH- vs. *Gonystylus spp.*-Extrakten - je 100g Zellstoff extrahiert

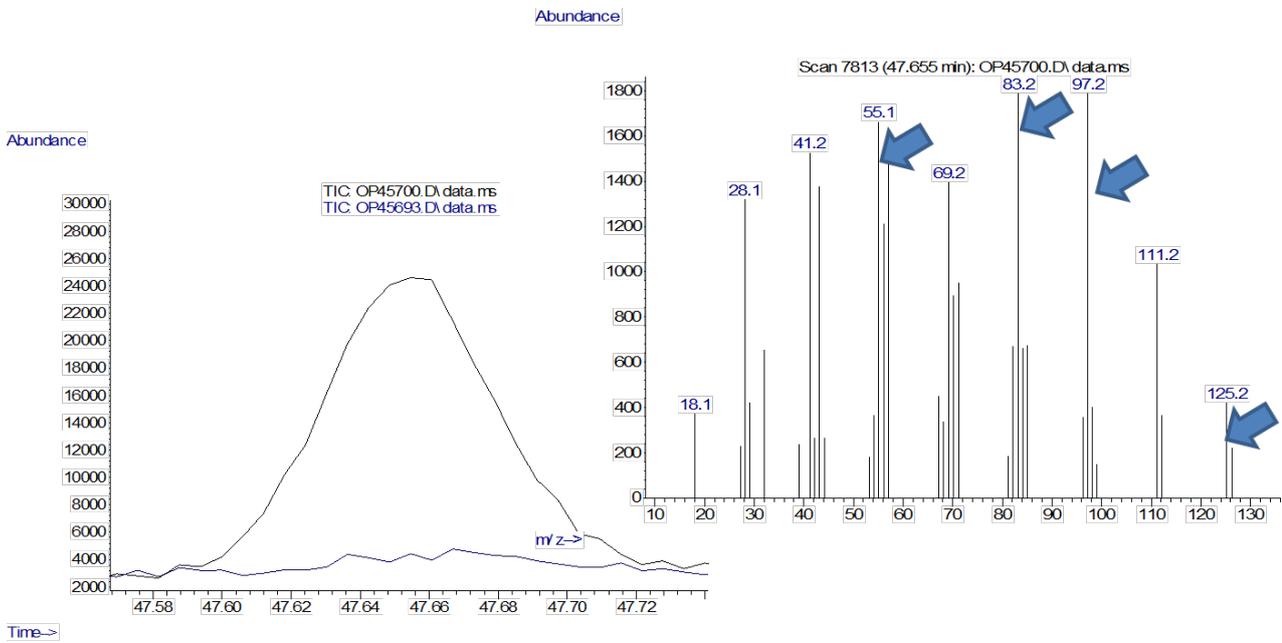


Abbildung 6: Potentieller Marker (RT=47.65 min) aus Vergleich von MTH- vs. *Gonystylus spp.*-Extrakten - je 100g Zellstoff extrahiert (Octadecen (MQ=87))

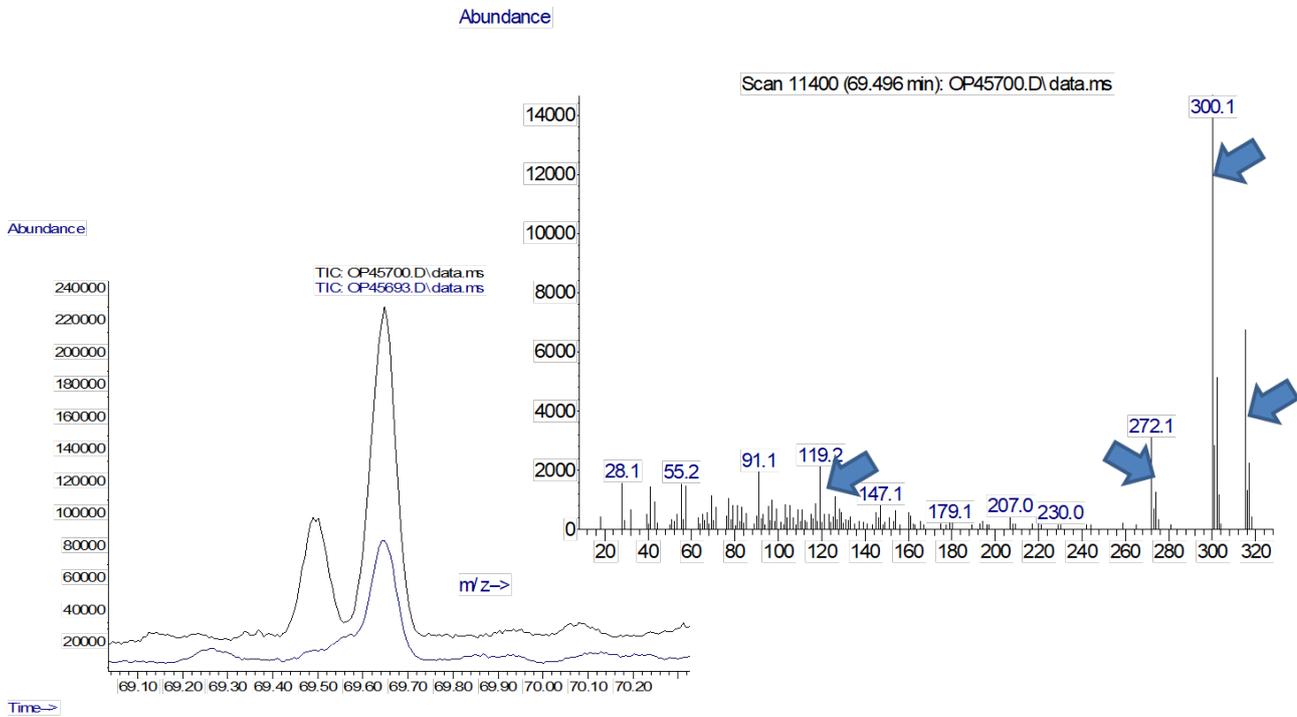


Abbildung 7: Potentieller Marker (RT=69,5 min) aus Vergleich von MTH- vs. *Gonystylus spp.*-Extrakten - je 100g Zellstoff extrahiert

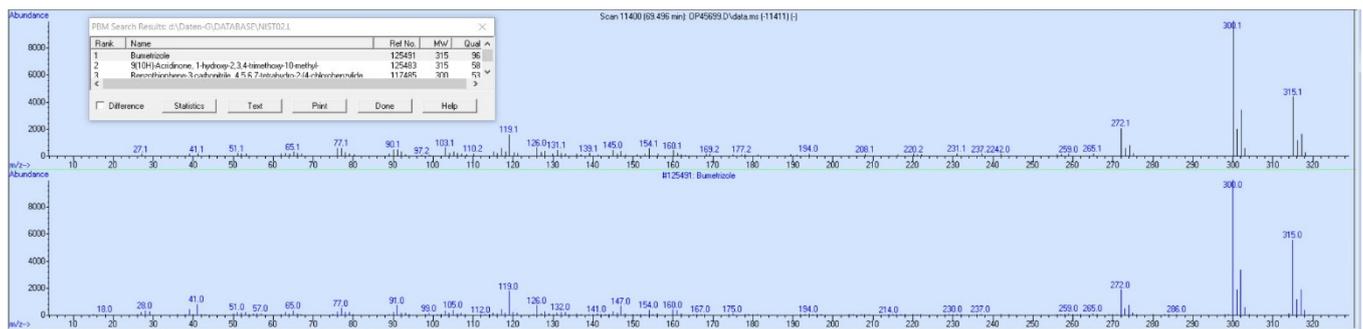


Abbildung 8: Bumetrizol

4.2.1.3. Vergleich von Extraktionsmethoden sowie unterschiedlichen Techniken zur Probenzerkleinerung

Drei Mühlenvarianten und zwei Extraktionsmethoden wurden untersucht. Zur Mahlung wurden eine Messermühle der Firma IKA, eine Scheibenschwingmühle der Firma Schröder und eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte Kugelschwingmühle der Firma Retsch verwendet. Für die Extraktion wurden die bewährte Soxhlet-Extraktion und die automatisierte Soxtherm-Extraktion verglichen. Wichtige Aspekte sowie die Vor- und Nachteile der Methoden sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Vor- und Nachteile der untersuchten Methoden zur Probenzerkleinerung und -extraktion

IKA Messermühle	Mahlergebnis: sehr voluminöses und fluffiges Mahlgut Mahldauer relativ kurz mit ca. 5 Minuten pro Mahlgang 10 g Zellstoff müssen auf 5-7 Mahlgänge aufgeteilt werden
Schröder Scheibenschwingmühle	Mahlergebnis: fein gemahlenes, pulverförmiges Mahlgut Mahldauer sehr kurz mit ca. 1,5 Minuten pro Mahlgang 10 g Zellstoff müssen auf 5-7 Mahlgänge aufgeteilt werden Während des Mahlvorganges können das Mahlgefäß und das Mahlgut warm werden
Retsch Kugelschwingmühle (Kryomühle)	Mahlergebnis: fein gemahlenes, pulverförmiges Mahlgut Mahldauer relativ lang mit ca. 15 Minuten pro Mahlgang 10 g Zellstoff müssen auf 5-7 Mahlgänge aufgeteilt werden Das Mahlgut wird stark gekühlt gemahlen, es kommt nicht zu lokalen Überhitzungen
Soxhletextraktion	Bewährte Methode zur Extraktion fester Substrate Einstellung der Temperatur und Einstellung der Zyklen erfolgt manuell Ein identischer Verlauf verschiedener Extraktionen ist schwer realisierbar Apparatur ist beliebig anpassbar an das Probenvolumen Relativ große Mengen an Lösungsmittel werden benötigt, mindestens 200ml
Soxthermextraktion	Automatisierte Abwandlung der Soxhletextraktion Der Verlauf der Extraktionen ist automatisiert und bei ordnungsgemäßer Anwendung immer identisch Probenvolumen ist nach oben begrenzt (10 g pulverförmiger Zellstoff passen in der Regel in eine Extraktionshülse) Relativ große Mengen an Lösungsmittel werden benötigt, ca. 140ml

Die Methoden wurden in sechs Kombinationen (Tabelle 5) miteinander verglichen. Jede Kombination wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Um zu überprüfen, wie umfassend eine Methode extrahiert, wurde jede Probe sukzessiv zweimal mit Petrolether extrahiert. Für jede Fraktion wurde der Anteil der extrahierten Extraktstoffe gravimetrisch bestimmt. Anschließend wurden alle Proben als Doppelbestimmung mit Thermodesorption bei 300°C gekoppelt mit Gaschromatographie und Massenspektrometrie analysiert. Anhand der Chromatogramme wurde jeweils die Anzahl der detektierbaren Peaks ermittelt.

Mit den verschiedenen Vorgehensweisen konnten Extraktstoffgehalte zwischen 0,052% und 0,156% erreicht werden. Dies sind zum einen sehr geringe Mengen an Extraktstoffen, zum anderen sind es verhältnismäßig große Unterschiede zwischen den sechs Vorgehensweisen. Auffällig ist, dass mit der jeweils zweiten Extraktion immer noch nennenswerte Mengen an Extraktstoffen extrahiert werden konnten. Es werden kaum qualitative Unterschiede im Vergleich zu ersten Extraktionen festgestellt. Es handelt sich eher Restmengen, die bei den ersten Extraktionen nicht erfasst wurden. Die Anzahl der detektierten Peaks gibt einen Hinweis auf die Vielfalt der Extraktstoffe, die erfasst wurden. Diese variiert zwischen 223 und 453 Peaks. Die Doppelbestimmungen belegen die Unterschiede zwischen den sechs verschiedenen Vorgehensweisen.

Tabelle 6: Ergebnisse der verschiedenen Kombinationen aus Probenzerkleinerung und Extraktion

	1.Extraktion [µg]	1. Extraktion [%]	2.Extraktion [µg]	2. Extraktion [%]	Anz. Peaks 1. Extraktion	Anz. Peaks 2. Extraktion
A1 - MessermühleSoxhlet						
<i>AW857-A-1P-2-I</i>	9708.33	0.103	4843.75	0.051	287	207
<i>AW857-A-1P-2-II</i>	11291.67	0.119	3656.25	0.039	271	228
Mittelwert	10500.00	0.111	4250.00	0.045	279	217
Summe			14750.00	0.156		
A2 - MessermühleSoxtherm						
<i>AW857-A-2P-2-I</i>	8541.67	0.090	3958.33	0.042	261	223
<i>AW857-A-2P-2-II</i>	7708.33	0.081	4583.33	0.048	253	249
Mittelwert	8125.00	0.086	4270.83	0.045	257	236
Summe			12395.83	0.131		
B1 - ScheibenschwingmühleSoxhlet						
<i>AW857-B-1P-2-I</i>	1687.50	0.018	3343.75	0.036	394	292
<i>AW857-B-1P-2-II</i>	2208.33	0.023	2562.50	0.027	345	292
Mittelwert	1947.92	0.021	2953.13	0.031	369	292
Summe			4901.04	0.052		
B2 - ScheibenschwingmühleSoxtherm						
<i>AW857-B-2P-2-I</i>	6562.50	0.070	906.25	0.010	348	342
<i>AW857-B-2P-2-II</i>	6625.00	0.070	1187.50	0.013	338	420
Mittelwert	6593.75	0.070	1046.88	0.011	343	381
Summe			7640.63	0.081		
C1 - CryomühleSoxhlet						
<i>NS857-C-1P-I</i>	2645.83	0.027	516.67	0.005	387	314
<i>NS857-C-1P-II</i>	2645.83	0.027	433.33	0.004	380	393
Mittelwert	6593.75	0.070	1046.88	0.011	383	353
Summe			7640.63	0.081		
C2 - CryomühleSoxtherm						
<i>AW-857-C-2P-I</i>	2800.00	0.028	2466.67	0.025	339	427
<i>AW-857-C-2P-II</i>	2762.50	0.028	2200.00	0.022	449	453
Mittelwert	6593.75	0.070	1046.88	0.011	394	440
Summe			7640.63	0.081		

Die Auswahl der im weiteren Verlauf verwendeten Methodik erfolgte anhand drei wichtiger Kriterien. Zum einen sollte sie eine gute Extraktion der Zellstoffe gewährleisten. Dies bedeutet, dass eine ausreichend große Menge an Extraktstoffen extrahiert werden kann und dass möglichst viele verschiedene Extraktstoffe erfasst werden. Außerdem sollte die Methodik in der Anwendung möglichst einfach und fehlerresistent sein, um eine große Anzahl von Proben schnell und sicher bearbeiten zu können. Mit diesen Kriterien fiel die Wahl auf die Kombination Mahlung mit der Kryomühle und Extraktion mit dem Soxtherm-Extraktor. Die Extraktstoffgehalte ergeben zwar nicht in allen getesteten Varianten die höchsten Massen, allerdings werden viele Extraktstoffe erfasst. Außerdem ist diese Kombination sehr gut in der Anwendung, da Mahlung und Extraktion teilweise automatisiert ablaufen.

4.2.2. Solid Phase Extraction

Durch eine Fraktionierung der Extrakte kann die anschließende Chromatographie für jede Fraktion besser angepasst, die Anzahl an verschiedenen Substanzen pro Chromatographielauf reduziert und damit die Trennleistung der Säule besser genutzt werden. Für die Vorfraktionierung von Zellstoffextrakten kommen verschiedene Varianten der Flüssigchromatographie in Frage, z. B. die *Solid Phase Extraction* (SPE) oder auch die *Gel Permeation Chromatography* (GPC). Innerhalb des Projekts wurden erste Versuche dazu mit SPE unternommen.

Um die Wirkung der *Solid Phase Extraction* zu testen, wurde die Vorgehensweise von (Del Rio et al. 2009) nachgestellt. Diese beruht auf der Verwendung von NH₂-Kartuschen und den Lösungsmitteln Hexan, Hexan:Chloroform (5:1), Chloroform und Diethylether:Essigsäure (98:2) zur Fraktionierung der Extraktstoffe.

Die ersten orientierenden Untersuchungen wurden mit einem industriell hergestellten MTH-Zellstoff durchgeführt. Die Extrakte wurden eingetrocknet, in Chloroform aufgenommen und auf die SPE-Kartuschen aufgebracht. Von den Kartuschen wurden die Fraktionen sukzessive entlang der eluotrophen Reihe mit den oben angegebenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen aus dem Ausgangsextrakt eluiert.

Wie der in Abbildung 9 dargestellte Ausschnitt aus den Chromatogrammen der MTH-Extraktfraktionen zeigt, erfüllt die Vorfraktionierung den gewünschten Zweck, der Gaschromatographie weniger komplex zusammengesetzte Mischungen zuzuführen. Während das Chromatogramm der Ausgangsprobe von dem extrem großen Peak bei 49.3 min dominiert wird, ist z. B. der Peak bei 46,1 min kaum wahrnehmbar, wird dann aber in der Chloroformfraktion viel deutlicher und mit einem wesentlich besseren S/N-ratio detektiert. Der Hexanextrakt wirkt noch immer überladen durch sich überlagernde Einzelverbindungen, die durch weitere Optimierungen der SPE-Bedingungen eventuell noch besser getrennt werden könnten. Aber auch ohne weitere Optimierung ist die vielfach bessere Ausgangssituation für die Auffindung gattungsspezifischer Marker aufgrund der durchgeführten Vortrennung erkennbar. Die Vortrennung nutzt die Annahme, dass in vielen Fällen davon ausgegangen werden kann, dass die wirklich diskriminierenden Einzelverbindungen in geringeren Anteilen vorliegen als die „gängigen“ in vielen Arten produzierten sekundären Pflanzenstoffe.

Festphasenextraktion (SPE)

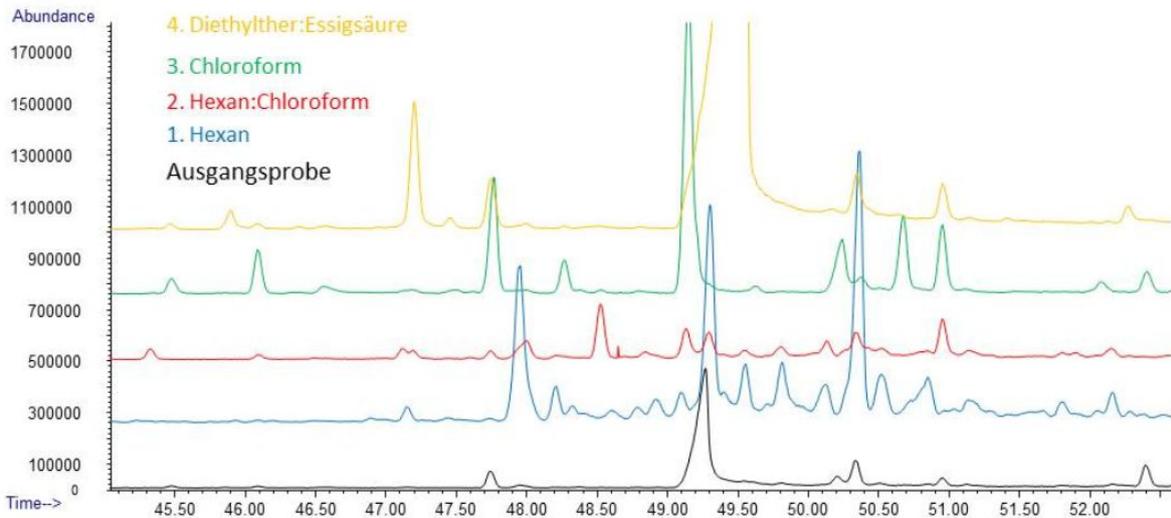


Abbildung 9: Ausschnitt aus den Chromatogrammen der Extraktstofffraktionen nach SPE von industriell hergestelltem MTH-Zellstoff

4.2.3. Analytik

Für eine möglichst gute Qualität der Chromatogramme ist eine Anpassung der Analytik an die Proben notwendig. Für die folgende Datenauswertung können dadurch bessere Ausgangsbedingungen geschaffen werden, gleichzeitig kann die Vorbereitung der Daten vor der Auswertung (Preprocessing) minimiert werden. Das Ziel war eine möglichst gute chromatographische Trennung der detektierbaren Verbindungen. Dazu gehört, den in der eindimensionalen Gaschromatographie teilweise auftretenden „Alkanberg“ besser aufzutrennen und dort versteckte Informationen zu erfassen. Diese Anpassung der Analytik wurde anhand einer Probe (industriell hergestellter MTH-Zellstoff) durchgeführt, bevor alle anderen Proben gemessen wurden. Eine bessere Kenntnis der Variabilität der Extrakte wird sicherlich Anlass zu weiteren Optimierungen der GC/MS-Analytik.

4.2.3.1. TD-GC/MS

Die hauseigene Analytik mit Thermodesorption gekoppelt mit eindimensionaler Gaschromatographie und massenselektiver Detektion konnte verbessert werden, indem das Temperaturprogramm der Gaschromatographie angepasst wurde. In Bereichen mit einer hohen Peakdichte, in denen Überlappungen häufiger vorkommen, wurde die Heizrate von 3°C/min auf 1°C/min oder 2°C/min herabgesetzt. Auf diese Weise können überlappende Peaks besser getrennt werden. Eine gute Auftrennung des „Alkanbergs“ wird dadurch allerdings nicht erreicht. Außerdem konnte die Extraktmenge pro Messung von ca. 150 µg auf 90 µg herabgesetzt werden, ohne Einbußen bei der Chromatogrammqualität verzeichnen zu können.

4.2.3.2. GCxGC

Erste Messungen wurden unternommen, um die Möglichkeiten der zweidimensionalen Gaschromatographie (GCxGC) zur Identifizierung von Holzgattungen oder vielleicht auch -arten im Zellstoff zu nutzen. GCxGC eignet sich sehr gut zur Analyse komplexer Proben und wird unter anderem in der Lebensmittelanalytik sowie der Petrochemie angewendet. Gegenüber der eindimensionalen GC bietet diese Methode eine bessere Auftrennung der Analyten. Zum Beispiel konnten (Mondello et al. 2005) anhand vergleichender Analysen von Parfümen zeigen, dass mittels GCxGC eine größere Anzahl von Einzelsubstanzen identifiziert werden kann. Auch (Eiserbeck et al. 2012) verglichen GC- und GCxGC- Methoden anhand verschiedener tertiärer Öle und Muttergesteine. Bei der Suche nach pflanzenstämmigen Biomarkern bemerkten sie die bessere Auftrennung der Eluenten mit GCxGC, welche bei eindimensionaler GC co-eluierten. Wie komplex diese Mischungen tatsächlich sein können wurde von (Kuhnert 2011) geschildert, der unter dem Thearubigenhügels eines Schwarzteeextrakts bis zu 30 000 Einzelverbindungen vermutet.

Wenn die Komplexität der vorliegenden Mischungen organischer Verbindungen zu hoch für die verwendete Chromatographie ist, äußert sich dies im Auftreten von sogenannten „Alkanbergen“ oder „UCMs“ (undissolved complex mixtures) wie sie mehr oder weniger stark ausgeprägt auch in den vorliegenden Extraktstoffchromatogrammen zu finden sind, zu sehen z. B. in Abbildung 5. Während die Vorfraktionierung, die in Kap. 4.2.2 untersucht wurde, versucht, die Komplexität schon vor der Chromatographie zu reduzieren, können geeigneten Kombinationen aus Chromatographie/Massenspektrometrie eingesetzt werden, um den Informationsgehalt der UCMs direkt in der Chromatographie nutzbar zu machen.

In ersten Versuchen mit den Zellstoffextrakten wurde in GCxGC/HRTOF-Messungen von Zellstoffextrakten eine Steigerung des Informationsgehaltes um den Faktor 10-100 erreicht (Abbildung 10).

GCxGC

1D GC: ca. 500 Peaks

GCxGC: ca. 5000 Peaks

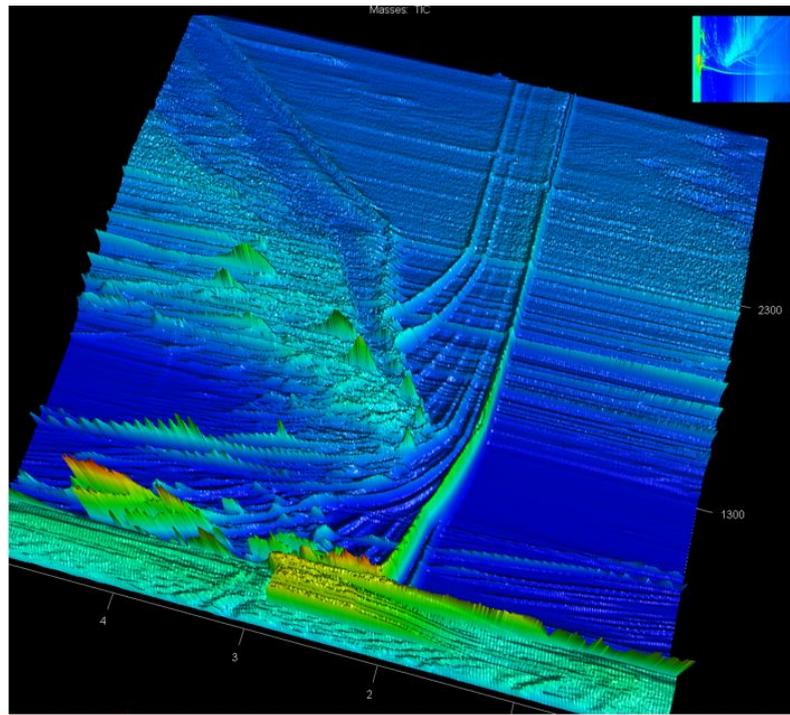


Abbildung 10: GCxGC/HRTOF-Messung eines Rubroshorea-Zellstoffextrakts

Eine erste Serie an Messungen ist vorhanden und befindet sich noch in der Auswertung. Die Bearbeiter der Studie versprechen sich eine der Steigerung des Informationsgehalts entsprechende Verbesserung bei der Markersuche für Identifizierungszwecke.

4.2.4. Wiederholbarkeit

Im Rahmen der Untersuchungen zur natürlichen Variabilität wurde der gleiche Zellstoff mehrfach (n=6) extrahiert und die Zusammensetzung der Extrakte mittels PCA auf systematische Unterschiede hin untersucht. Die Probenvorbereitung und Analytik erfolgte wie in den vorhergehenden Abschnitten (Kapitel 4.2) beschrieben. Die 6 Extrakte wurden als Dreifachbestimmung gemessen. Die resultierenden Chromatogramme wurden mit der für Kapitel 4.7.1 entwickelten Ionenliste ausgewertet und die erhaltenen Daten analog zu der in Kapitel 4.7.1 beschriebenen Verfahrensweise für die PCA-Auswertung aufbereitet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Abbildung 11 und der Abbildung 12 dargestellt.

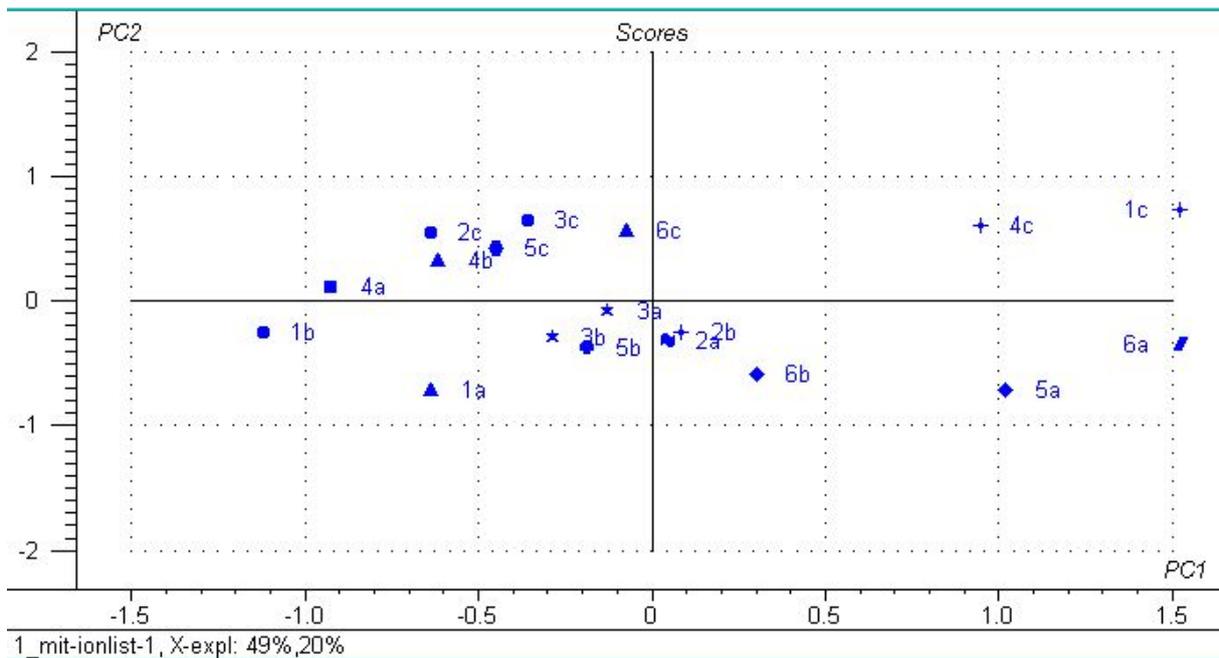


Abbildung 11: Mehrfachextraktion (n=6) des Rubroshorea-Zellstoffs 839-9

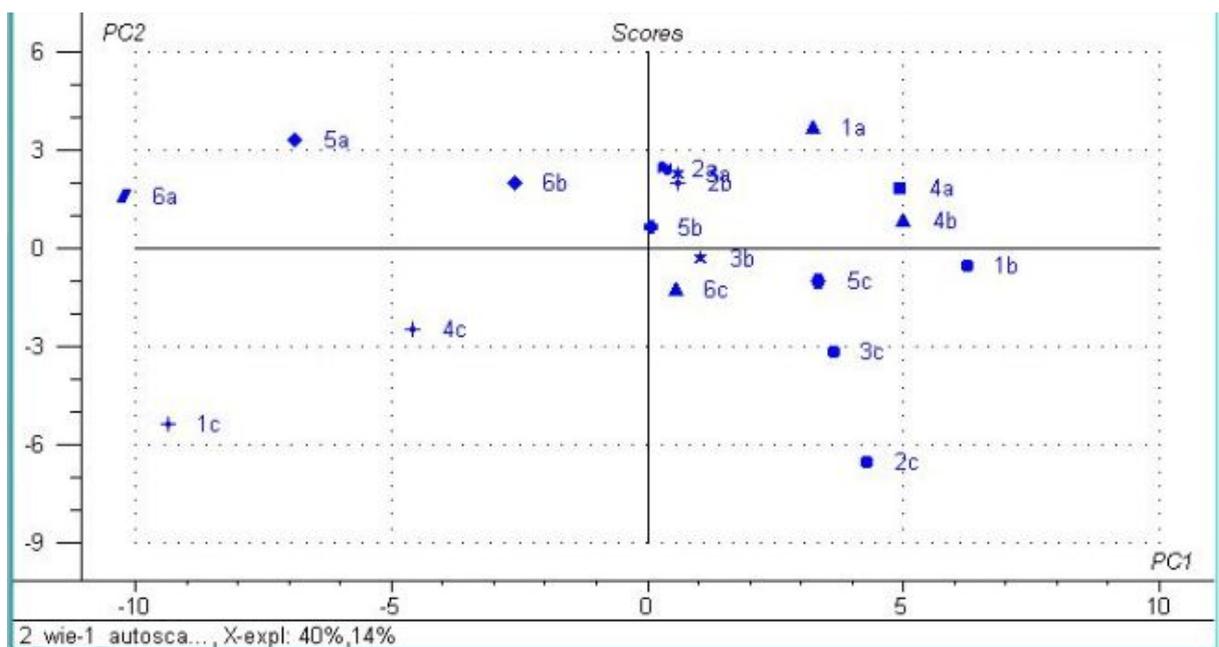


Abbildung 12: Mehrfachextraktion (n=6) des Rubroshorea-Zellstoffs 839-9-autoscaled

Durch eine Autoscalierung der Daten werden alle Einzelwerte der Auswertetabelle, die sich nach der Integration der GC/MS-Datensätze ergeben, durch die Standardabweichung der Spaltenwerte geteilt. Dadurch wird der Einfluss der absoluten Signalintensität auf die PCA verringert und die einzelnen Variablen fließen mit ähnlicher Gewichtung in die PCA ein. In beiden Fällen zeigen die beiden score-plots keine Gruppierung der Daten. Es finden sich somit keine Hinweise auf systematische Unterschiede zwischen den identisch hergestellten Analysenproben, was für die Wiederholbarkeit der angewendeten Methodik, bestehend aus Probenvorbereitung und Analytik, spricht.

4.3. Optimierung der Datenauswertung für chemotaxonomische Untersuchungen (AP 3)

4.3.1. Geeignete Datenbanksoftware

Durch die Probenvorbereitung und Analytik werden die noch vorhandenen sekundären, extrahierbaren Pflanzenstoffe eines Zellstoffes weitgehend erfasst. Die Informationen zur qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Extrakte liegen anschließend in Form von chromatographischen und massenspektrometrischen Datensätzen vor. Die Auswertung dieser Daten hat zum Ziel, alle chromatographierten Analyten, also alle chemotaxonomischen Merkmale, zu erfassen und in einer Datenbank zu speichern. Erste Voruntersuchungen haben gezeigt, dass eine geeignete Vorbehandlung der Daten, „Pretreatment“ genannt, Artefakte beseitigen oder ausgleichen kann. Die Qualität der Chromatogramme wird dadurch verbessert und für jeden Peak im Chromatogramm, der wiederum für eine Komponente der komplexen Extraktstoffmischung steht, können charakteristische Eigenschaften wie Retentionszeit, Retentionsindex, Peakfläche oder Peakhöhe sicherer ermittelt werden. Die zu erstellende Datenbank muss so aufgebaut sein, dass die in einer unbekanntem Zellstoffprobe enthaltenen Gattungen bestimmt werden können. Allgemeiner formuliert geht es um die Bestimmung der Zusammensetzung komplexer Mischungen.

Die bisher verwendete In-house Software „AMDIS DB“ weist einige Nachteile auf, zum Beispiel das umständliche Handling, aber auch Fehler bei der Erstellung der Datenbanken, aber auch bei der Datenbanknutzung. Aus diesem Grund wurden verschiedene Softwareprogramme, welche eine Datenbanklösung beinhalten, auf ihre Eignung Mischungskomponenten zu identifizieren getestet. Das wichtigste Kriterium ist dabei die getrennte Auswertung der chromatographisch getrennten Einzelverbindung. Als vorteilhaft werden auch geeignete Werkzeuge zur Datenvorbehandlung und ein gutes Handling der Software erachtet. Die Beschreibung der Vor- und Nachteile der getesteten Softwarepakete *MSChromsearch*, *ACD/Labs MS Workbook Suite*, *F-Search* und *Openchrom* aus dem Blickwinkel der Projektaufgabe ist im Zwischenbericht 2016 zu finden.

Die Wahl fiel auf die Nutzung der enterprise edition von *Openchrom 1.2.0*. *OpenChrom* bietet Werkzeuge zur Vorbereitung der Daten (pre-processing) und zur Detektion und Integration der Peaks. Mehrere wissenschaftlich dokumentierte und diskutierte Algorithmen sind implementiert und können genutzt werden. Dies ermöglicht es, die Daten weitestgehend innerhalb einer Programmumgebung zu bearbeiten. Den Ausschlag gab die jedoch die prinzipielle Vorgehensweise der Datenbankerstellung in *Openchrom*, die nicht auf die Identifizierung von „Reinstoffen“ abzielt, sondern auf die Erfassung der Komponenten komplexer Mischungen. Der verfolgte Ansatz ist in Abbildung 14 und Abbildung 42 dargestellt.

4.3.2. „Pretreatment“ der Daten

Die Datenauswertung der Chromatogramme hat zum Ziel, alle in den Chromatogrammen enthaltenen Informationen, also möglichst viele Einzelverbindungen zu identifizieren. Erste Voruntersuchungen haben gezeigt, dass eine geeignete Vorbehandlung der Daten, auch *Pretreatment* genannt, Artefakte beseitigen oder ausgleichen kann. Die Qualität der Chromatogramme wird dadurch verbessert und für jeden Peak können charakteristische Eigenschaften wie Retentionszeit, Retentionsindex, Peakfläche

oder Peakhöhe sicherer ermittelt werden. Wichtig sind hierbei die richtige Auswahl der *Pretreatment*-Methoden und die Entwicklung von Methoden zur Beurteilung der Chromatogrammqualität, bevor die Daten in die Datenbank aufgenommen werden.

Die Software „Openchrom“ beinhaltet verschiedene Filter zur Bearbeitung von Chromatogrammen. Von den in der Software implementierten Filtern sind für das Preprocessing der GC/MS-Daten zunächst der *Savitzky-Golay* Filter, der *CODA* Filter, der *Backfolding* Filter und der *Denoising* Filter interessant. Alle vier Filter wurden auf die Originaldaten angewendet. Ein Ausschnitt aus diesen Versuchen zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7: Vergleich verschiedener Preprocessing Kombinationen, angegeben ist die Anzahl der detektierten Peaks

Lauf	Original	Savitzky-Golay	Savitzky-Golay +	CODA (0.75)	Savitzky +	CODA (0.6)	+Savitzky	CODA (0.6)	+Savitzky +	CODA (0.5)	+Savitzky	CODA (0.5)	+Savitzky +				
OP49109	292	402	432	240	281	405	426	324	298	409	438	291	403	431			
OP49112	82	109	109	90	101	110	111	104	85	109	108	84	110	106			
OP49121	258	417	471	232	294	415	399	344	257	412	460	261	417	472			
OP49133	78	91	96	62	74	88	91	81	85	92	97	80	94	95			
OP49137	254	350	355	224	256	334	312	271	224	288	302	254	352	354			
OP49197	83	112	107	68	77	109	103	87	91	112	105	84	114	108			
OP49205	109	138	145	85	94	146	125	97	114	131	137	100	137	140			
OP49213	75	82	92	54	65	86	83	71	78	80	94	73	86	92			
OP49217	51	56	56	51	46	51	50	49	50	54	54	51	55	53			
OP49224	99	108	114	68	78	107	102	75	87	87	111	83	111	110			
OP49237	87	96	111	63	67	93	96	76	78	100	103	82	97	108			
OP49274	78	106	100	71	72	100	101	80	79	106	100	78	104	96			
OP49293	83	106	110	74	83	99	99	92	85	100	100	79	103	103			
OP49299	84	99	100	80	90	95	92	87	82	98	98	82	98	98			

Die bisherigen Erfahrungen mit Datenbankerstellung für GC/MS-Daten legten nahe, das positive Daten-*Pretreatment* aus den ersten orientierenden Untersuchungen (DBU-Projekt AZ-29436) mit einer *AMDIS* (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) zu kombinieren (Wenig und Odermatt 2010). Nach Tabelle 1 erscheint eine zweimalige Anwendung des *Savitzky-Golay*-Glättungsfilters als Daten-*Pretreatment* geeignet. Die genauere Betrachtung hat jedoch ergeben, dass die Glättung nur das TIC-Signal betrifft, aber die einzelnen Massenspuren unverändert bleiben. Deshalb ergeben sich keine positiven Effekte bei der nachfolgenden *AMDIS-Deconvolution*. Verschiedene Kombinationen von Daten-*Pretreatment* und *AMDIS-Deconvolution* zeigten, dass mit den relativ stark verrauschten Daten, die für die Datenbankerstellung zur Verfügung standen, eine *Deconvolution* der Daten unbefriedigend ist. Es wurde für die Datenbankerstellung daher eine zurückhaltende Strategie gewählt und lediglich eine Hintergrundbereinigung durch die „ion remover“-Funktion der *Openchrom*-Software ohne *Deconvolution* als Datenvorbehandlung gewählt. Die *Peakdetektion* und *Peakintegration* erfolgten ebenfalls durch *Openchrom*. Da sich die relativ große Anzahl von Messungen über einen längeren Zeitraum erstreckten, können die Retentionszeiten (RT) der Chromatographie nicht konstant gehalten werden. Die Berechnung der erforderlichen Retentionsindices auf Basis von Alkanstandards erfolgte ebenfalls durch *Openchrom*. Die so bearbeiteten Datensätze wurden in dem *openchrom*-spezifischen *.ocb-Format für die Datenbankerstellung (s. Kap. 4.4.1) gespeichert. Beispielhaft für die verrauschten Daten steht ein Ausschnitt aus einem *Koompasia*-extraktchromatogramms (Abbildung 13). Während das TIC-Signal noch akzeptabel aussieht, sind die einzelnen Massenspuren so stark verrauscht, so dass der Algorithmus der *AMDIS-Deconvolution* keine sinnvollen Ergebnisse liefert.

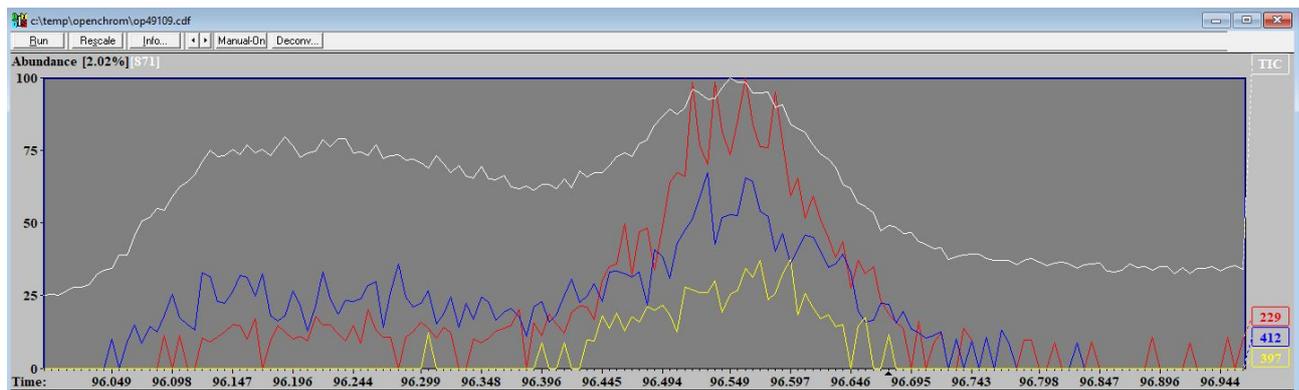


Abbildung 13: Ausschnitt aus dem Chromatogramm des Koopassia Zellstoffextrakts

Die Datenaufbereitung für die Datenerfassung in Kap. 4.4 wurde mit Bedingungen durchgeführt, die zu einer relativ niedrigen Anzahl von Referenzverbindungen für die Datenbankerstellung führen. Diese relativ einfache Vorgehensweise wurde aufgrund der bestehenden Randbedingungen gewählt. Die Trennung der Extrakte ist noch nicht optimal, s. Kommentar zu den „UCMs“ in Kap. 4.2.1.2. Die Qualität der Datensätze ist ebenfalls suboptimal, da die Massensignale relativ stark verrauscht sind. Eine intensivere Optimierung der Bedingungen des Daten-*Pretreatments* ist sinnvoller, wenn zumindest die Massensignale qualitativ hochwertiger sind. Die gewählten Bedingungen wurden aber als ausreichend erachtet, um die generelle Leistungsfähigkeit des Ansatzes zu zeigen, s. Kap. 4.4.

4.4. Chemotaxonomische Erfassung aller ausgewählten Gattungen (AP 4)

Mit den in den Arbeitspaketen 2 und 3 gewonnenen Erkenntnissen an ausgewählten Proben wurden die chemotaxonomischen Merkmale aller 31 Gattungen anhand der eindimensionalen Chromatogramme erfasst und in eine Datenbank überführt. Die Datenbank dient als Ausgangspunkt bei der Identifizierung der Praxisbeispiele in Kap. 4.8.

4.4.1. Datenbankerstellung

Bei der Datenbankerstellung sollen die folgenden Aspekte adressiert werden:

- Bereinigung der Chromatogramme
 - Hintergrund
 - Säulenbluten
 - Überlagerungen
- Verwendung von Retentionsindizes
- Relevante Massenspektren erfassen
- Problemspezifische Datenbanken erstellen

Die Erstellung der Datenbank erfolgt wie in Abbildung 14 dargestellt. Das Schema soll betonen, dass die einzelnen, in den Chromatogrammen detektierten Substanzen mit ihren charakteristischen Informationen in der Datenbank abgelegt werden. Direkt bei der Datenbankerstellung erfolgt ein Abgleich der detektierten Einzelsubstanzen, indem ermittelt wird, wie häufig, also in wie vielen Referenzextrakten die einzelnen Substanzen vorkommen.

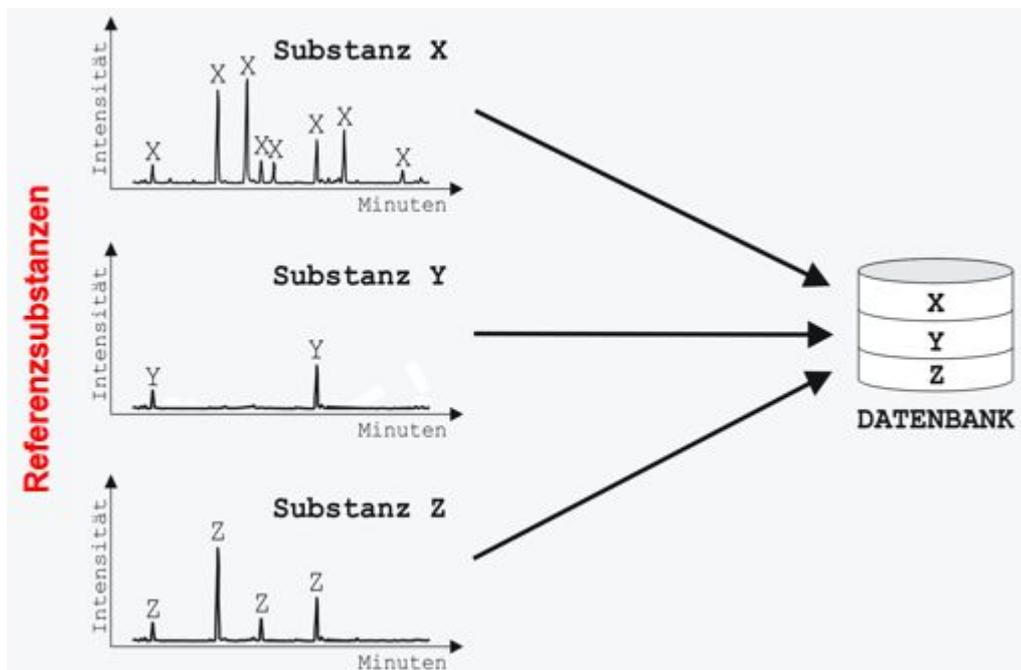


Abbildung 14: Generelles Schema der Datenbankerstellung

Die Datenvorbehandlung erfolgte wie in Kap. 4.3.2 beschrieben. Für die eigentliche Datenbankerstellung werden die GC/MS-Daten der Zellstoff-Extrakte der Gattungen aus Tabelle 10 im

Anhang nach der in Kap. 4.3.2. beschriebenen Datenvorbehandlung verwendet. Die Extrakte wurden hierzu als Dreifachbestimmung gemessen. Nach ca. 30 Messungen erfolgte jeweils die Messung eines Alkanstandards zur Ermittlung der RI. Die Dreifachbestimmungen wurden durch Übereinanderlegen verglichen, um Ausreißer oder Unregelmäßigkeiten erkennen zu können. Es wurde jeweils ein für jede Gattung typischer GC-Lauf für die Datenbankerstellung ausgewählt. Einen Ausschnitt der verwendeten Referenzextrakte zeigt in Abbildung 15. Es ergab sich eine MTH-Datenbank mit 560 Einzelsubstanzen.

Wie oben erwähnt, werden die Einzelverbindungen nicht nur erfasst, sondern die Datenbanksoftware vergleicht die erfassten Einzelsubstanzen und ermittelt, wie häufig die Einzelsubstanzen in den Referenzextrakten vorkommen. Je spezifischer die Einzelsubstanzen sind, desto wertvoller sind sie für Identifizierungszwecke von unbekanntem Proben. Einen Eindruck vermitteln die Abbildung 16, die Abbildung 17 und die Abbildung 18. Es werden für jede Einzelsubstanz eindeutige „IDs“ vergeben. Die Zusatzinformationen zu jeder erfassten Einzelverbindung, wie RI, RT und Herkunft sind der Tabelle zu entnehmen. Die Qualität der Datenbank ist stark abhängig von der Qualität der erhobenen Daten, die wiederum von der gesamten Analytikstrecke abhängt. Die Zusammensetzung der Datenbank kann darüber hinaus stark von den Parametern bei der Peak Detektion, der Datenvorbehandlung im Allgemeinen aber auch durch die Parameter beim Abgleich der Einzelsubstanzen beeinflusst werden. Im aktuellen Projekt war leider keine Zeit, an dieser Stelle ausführlichere Optimierungen vorzunehmen, die nötig sind, um die volle Leistungsfähigkeit des Ansatzes zu belegen. Die Datenbank muss wie ein leistungsfähiges, anspruchsvolles Werkzeug gesehen werden und die Anwender müssen lernen, dieses Werkzeug für die jeweiligen Fragestellungen möglichst effizient zu nutzen.

ChromIdent Origins				
Active	File	Samples ▲	Area Weight	Reference Peak Count
<input checked="" type="checkbox"/>	OP48734	[Acacia]	1	27
<input checked="" type="checkbox"/>	OP49002	[Alniphyllum]	1	49
<input checked="" type="checkbox"/>	OP48981	[Anthoshorea]	1	25
<input checked="" type="checkbox"/>	OP48752	[Avicennia]	1	85
<input checked="" type="checkbox"/>	OP49133	[Calophyllum]	1	31
<input checked="" type="checkbox"/>	OP49267	[Canarium]	1	48
<input checked="" type="checkbox"/>	OP49299	[Castanopsis]	1	43
<input checked="" type="checkbox"/>	OP49226	[Cocos]	1	35
<input checked="" type="checkbox"/>	OP49238	[Dendrocalamus]	1	31

Abbildung 15: Ausschnitt aus der MTH-Datenbank für sortenreine Zellstoffextrakte

ChromIdent Databases ChromIdent Library Peaks Chromatogram File Explorer (MSD)

Active	Sample	Peak Area	Effective P...	Peak Area ...	Effective P...	RI	RT (min)	Origins	Reference Peak Count	ID
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia]	2,388,407	2,388,407	1	[[own,1.0]]	29,112	84.018	[OP48734]	1	228
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia]	32,631,267	32,631,267	1	[[own,1.0]]	26,974	74.489	[OP48734]	1	218
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia]	2,835,512	2,835,512	1	[[own,1.0]]	26,342	71.986	[OP48734]	1	216
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia]	1,459,154	1,459,154	1	[[own,1.0]]	24,307	64.825	[OP48734]	1	204
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia]	1,532,248	1,532,248	1	[[own,1.0]]	23,286	61.836	[OP48734]	1	198
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia]	3,850,360	3,850,360	1	[[own,1.0]]	23,011	61.063	[OP48734]	1	196
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia]	1,754,573	1,754,573	1	[[own,1.0]]	22,098	58.615	[OP48734]	1	192
<input checked="" type="checkbox"/>	[Alniphyllum]	8,989,841	8,989,841	1	[[own,1.0]]	33,043	105.323	[OP49002]	1	1573
<input checked="" type="checkbox"/>	[Alniphyllum]	128,543	128,543	1	[[own,1.0]]	34,461	112.398	[OP49002]	1	1571

Abbildung 16: Ausschnitt aus der MTH-Datenbank – mit Substanzen, die nur in einem Referenzextrakt vorkommen

ChromIdent Databases ChromIdent Library Peaks Chromatogram File Explorer (MSD)

Active	Sample	Peak Area	Effective P...	Peak Area ...	Effective P...	RI	RT (min)	Origins	Reference Peak Count	ID
<input checked="" type="checkbox"/>	[Swintonia, Mangifera]	27,590,325	27,590,325	1	[[own,1.0]]	31,634	96.415	[OP48736, ...]	2	294
<input checked="" type="checkbox"/>	[Swintonia, Mangifera]	8,602,370	8,602,370	1	[[own,1.0]]	30,012	88.329	[OP48736, ...]	2	282
<input checked="" type="checkbox"/>	[Swintonia, Paulownia]	14,285,276	14,285,276	1	[[own,1.0]]	16,498	39.803	[OP48789, ...]	2	1282
<input checked="" type="checkbox"/>	[Hevea, Ilex]	12,259,400	12,259,400	1	[[own,1.0]]	32,254	101.049	[OP49275, ...]	3	2037
<input checked="" type="checkbox"/>	[Ilex, Castanopsis]	19,529,032	19,529,032	1	[[own,1.0]]	29,136	85.4	[OP49299, ...]	3	2157
<input checked="" type="checkbox"/>	[Ilex, Castanopsis]	46,191,248	46,191,248	1	[[own,1.0]]	28,536	82.563	[OP49299, ...]	3	2153
<input checked="" type="checkbox"/>	[Ilex, Dendrocalamus]	48,301,877	48,301,877	1	[[own,1.0]]	26,001	71.536	[OP49238, ...]	3	1934
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia, Castanopsis, Subg-Richetia]	7,978,151	7,978,151	1	[[own,1.0]]	24,944	67.669	[OP48734, ...]	3	236
<input checked="" type="checkbox"/>	[Acacia, Castanopsis, Subg-Richetia]	108,939,424	108,939,424	1	[[own,1.0]]	27,330	77.229	[OP48734, ...]	3	230

Abbildung 17: Ausschnitt aus der MTH-Datenbank - mit Substanzen, die in 2 und 3 Referenzextrakten vorkommen

ChromIdent Databases ChromIdent Library Peaks Chromatogram File Explorer (MSD)

Active	Sample	Peak Area	Effective P...	Peak Area ...	Effective P...	RI	RT (min)	Origins	Reference Peak Count	ID
<input checked="" type="checkbox"/>	[Rhizophora, Schima, Hevea, Ilex, Nyssa, Calophyllum, Lophopetalum, Canariu...]	24,052,218	24,052,218	1	[[own,1.0]]	24,172	65.085	[OP49226, ...]	10	1687
<input checked="" type="checkbox"/>	[Schima, Hevea, Ilex, Lophopetalum, Nyssa, Dendrocalamus, Canarium, Cocos, ...]	112,180,458	112,180,458	1	[[own,1.0]]	27,944	79.817	[OP49238, ...]	10	1759
<input checked="" type="checkbox"/>	[Schima, Hevea, Ilex, Nyssa, Castanopsis, Dendrocalamus, Canarium, Intia, Coc...]	79,555,686	79,555,686	1	[[own,1.0]]	27,628	78.422	[OP49238, ...]	10	1790
<input checked="" type="checkbox"/>	[Eucalyptus, Swintonia, Avicennia, Mangifera, Castanopsis, Parashorea, Subg-R...]	146,930,531	146,930,531	1	[[own,1.0]]	33,077	105.214	[OP48736, ...]	10	374
<input checked="" type="checkbox"/>	[Subg-Shorea, Gonystylus-3A, Swintonia, Avicennia, Dipterocarpus, Gonystylu...]	19,156,985	19,156,985	1	[[own,1.0]]	0	0.651	[OP48747, ...]	10	426
<input checked="" type="checkbox"/>	[Swintonia, Gonystylus-3A, Mangifera, Avicennia, Acacia, Gonystylus-3C, Subg...]	23,744,375	23,744,375	1	[[own,1.0]]	11,058	16.084	[OP48736, ...]	10	186
<input checked="" type="checkbox"/>	[Eucalyptus, Ilex, Swintonia, Avicennia, Castanopsis, Parashorea, Gonystylus-3...]	171,077,073	171,077,073	1	[[own,1.0]]	29,631	87.823	[OP48778, ...]	11	600
<input checked="" type="checkbox"/>	[Eucalyptus, Rhizophora, Durio, Ilex, Lophopetalum, Dendrocalamus, Subg-Ric...]	86,823,375	86,823,375	1	[[own,1.0]]	21,983	58.883	[OP49238, ...]	11	1173

Abbildung 18: Ausschnitt aus der MTH-Datenbank - mit Substanzen, die in 10 und mehr Referenzextrakten vorkommen

4.4.2. Nachweis der Gattung *Gonystylus spp.*

Gonystylus spp. nimmt im Rahmen der Untersuchungen eine Sonderrolle ein. Diese Sonderrolle ist begründet im hohen Schutzstatus (Cites II) sowie durch das natürliche Verbreitungsgebiet der wichtigsten Holzhandelsart, *Gonystylus bancanus*, Kalimantan, einer Region des malaiischen Archipels, die für intensive Zerstörung der tropischen Primärwälder bekannt ist. Deshalb wurde versucht, *Gonystylus spp.* gezielt in Zellstoffmischungen nachzuweisen oder gar zu quantifizieren.

4.4.2.1. MTH versus *Gonystylus spp.* (849-1)

In ersten, orientierenden Untersuchungen (Untersuchungsnummer: 796) wurde sortenreiner Zellstoff aus *Gonystylus spp.* (849-1) in definierten Massenanteilen (1 / 2 / 5 / 10 / 30 / 50 / 75 und 100%) einem industriell hergestellten MTH(mixed tropical hardwood)-Zellstoff beigemischt. Diese Mischungen wurden extrahiert und in den Extrakten wurde gezielt nach *Gonystylus spp.* spezifischen Markern

gesucht. Als Marker werden in diesem Zusammenhang Holzinhaltstoffe bezeichnet, die möglichst spezifisch für *Gonystylus spp.* sind, also möglichst nicht in anderen Zellstoffextrakten vorkommen. Die Vorgehensweise entspricht der Entwicklung von Quantifizierungsmethoden wie sie auch für die Quantifizierung von synthetischen Papieradditiven beschrieben sind (Odermatt et al. 2005).

Es konnten drei vielversprechende Marker in dieser ersten Teiluntersuchung gefunden werden.

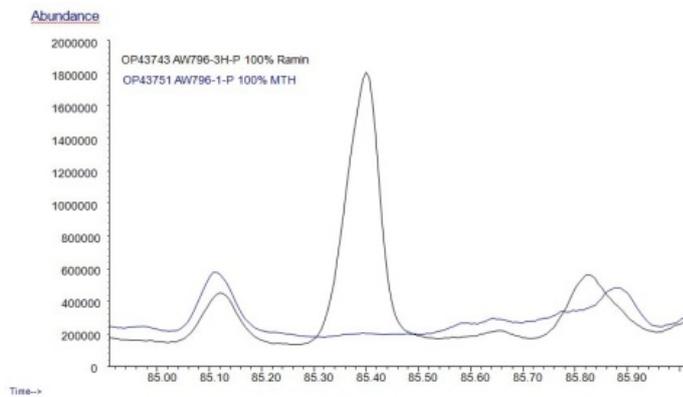


Abbildung 19: Potentieller Marker bei RT=85,4 min für den Nachweis und die Quantifizierung von *Gonystylus spp.*

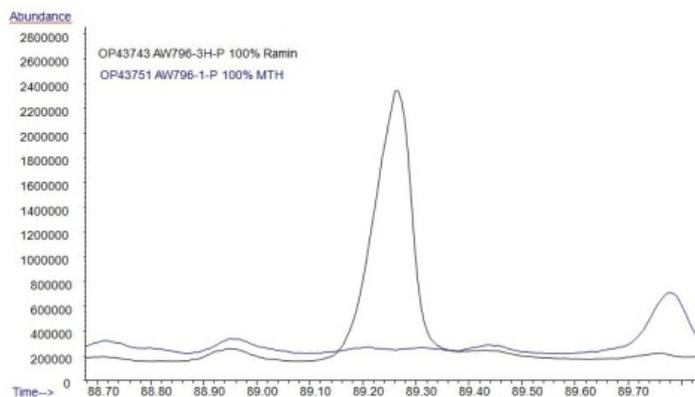


Abbildung 20: Potentieller Marker bei RT=89,25 min für den Nachweis und die Quantifizierung von *Gonystylus spp.*

Auf Basis ausgewählter Massenspuren der drei Marker konnten Kalibrierkurven berechnet werden, die auch bei niedrigen *Gonystylus spp.*-Anteilen noch annehmbare Bestimmtheitsmaße zeigen.

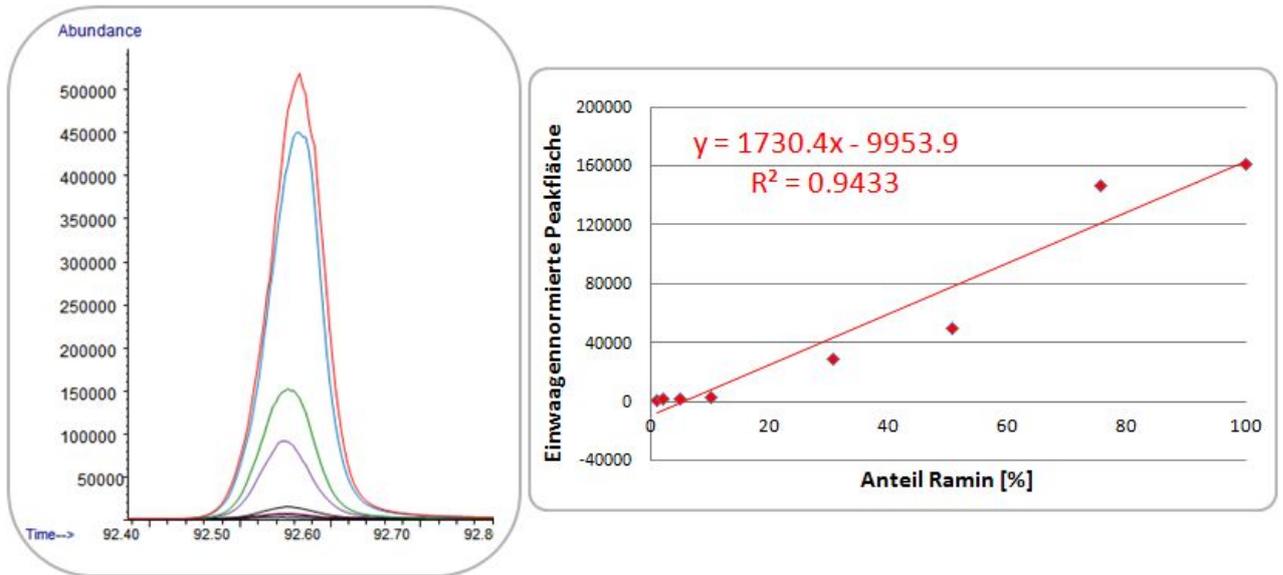


Abbildung 21: Potentieller Marker bei RT=92,6 min für den Nachweis und die Quantifizierung von *Gonystylus spp.* sowie eine Kalibrierkurve für den Bereich von 0-100% Massenanteil.

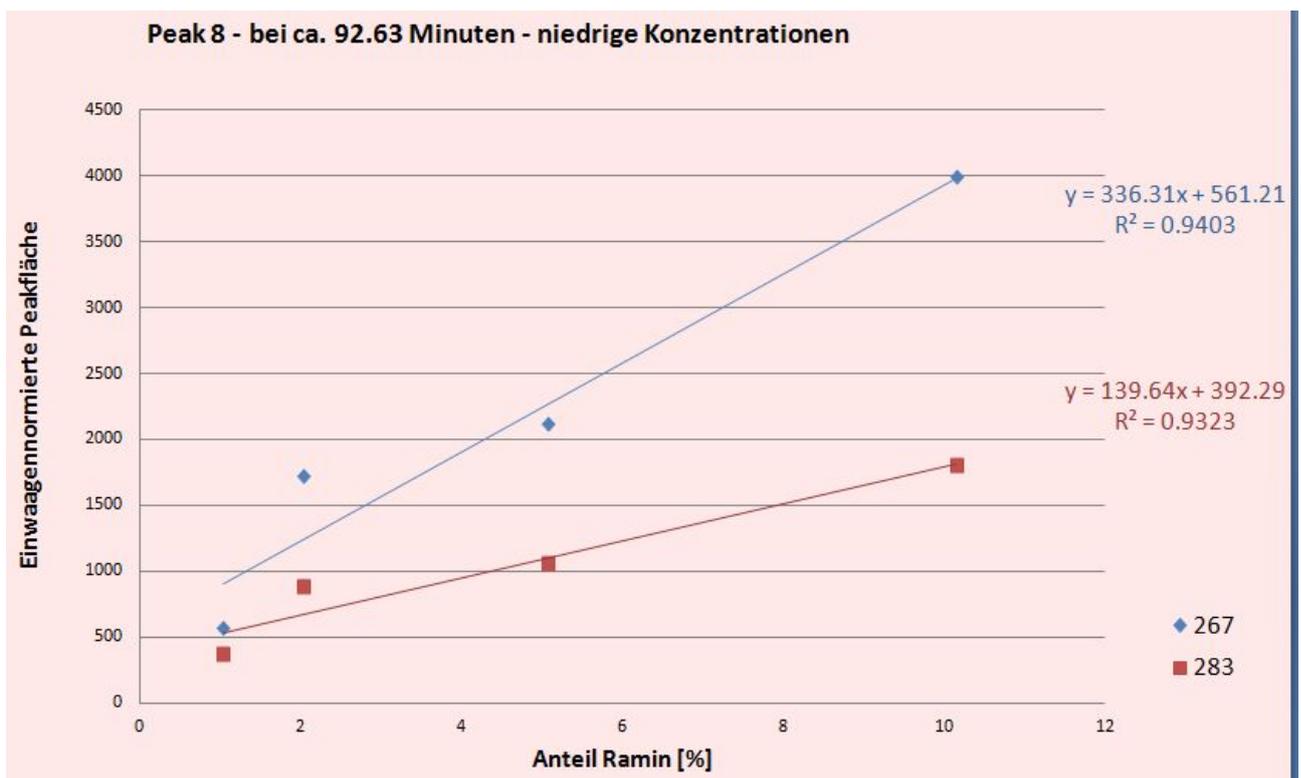


Abbildung 22: Potentieller Marker bei RT=92,6 min für den Nachweis und die Quantifizierung von *Gonystylus spp.* sowie eine Kalibrierkurve für den Bereich von 0-10% Massenanteil.

4.4.2.2. MTH versus *Gonystylus spp.* (849-3B)

Die in den Teiluntersuchungen 4.2.1.1, 4.2.1.2 und 4.4.2.3 gefundenen Marker sollten in einem folgenden Untersuchungsabschnitt (Helena Burkhardt 2016) genutzt werden, um mit neuen Kalibrierkurven die obigen Ergebnisse zu bestätigen und die Bestimmtheitsmaße der sich ergebenden Kalibrierkurven zu verbessern (Untersuchungsnummer: 874). Für diese Untersuchungen musste eine andere *Gonystylus spp.*-Charge (849-3B) verwendet werden, da die in der obigen Versuchsreihe genutzte Charge aufgebraucht war. Dies wurde zum Zeitpunkt der Versuchsplanung als nicht gravierend eingestuft, da davon ausgegangen wurde, dass zumindest ein Teil der gefundenen Marker sich als gattungsspezifisch erweist und daher für alle Arten der Gattung verwendet werden kann. Die in diesem Untersuchungsabschnitt verwendete *Gonystylus spp.*-Charge unterscheidet sich auch von der in Kap. 4.2.1.2 verwendeten Charge, die für die Extraktionen im großen Maßstab aufgebraucht wurde.

Wie in der oben dargestellten, ersten orientierenden Untersuchung wurde wieder der industriell hergestellte MTH-Zellstoff als Matrix verwendet und diesem Zellstoff definierte Mengen des *Gonystylus spp.*-Zellstoffs zugemischt. Diese Mischungen wurden wieder sukzessive mit Petrolether und Aceton extrahiert.

Die drei sich im vorherigen Abschnitt als sehr vielversprechend erscheinenden Marker-Verbindungen konnten in dem neuen Untersuchungsabschnitt nicht wiedergefunden werden. Das gleiche gilt für einen Teil der aus Kap. 4.2.1.2 stammenden Marker-Verbindungen. Als Erklärungen dienen die Unterschiede in den Versuchsreihen. Im ersten Fall (Untersuchungsnummer 796) wurde ein anderes Extraktionsverfahren genutzt, das ASE-Verfahren, und ein anderer *Gonystylus spp.*-Zellstoff verwendet. Im zweiten Fall (Untersuchungsnummer 852) stammen die Marker aus einer Soxhlet-Extraktion mit 100g und es wurde ebenfalls ein anderer *Gonystylus spp.*-Zellstoff verwendet.

Vergleiche mit anderen Untersuchungen legen nahe, dass es sich bei den drei in Kap. 4.4.2.1 ermittelten Marker, die in Kap. 4.4.2.1 sehr vielversprechende Kalibrierkurven zeigen, um Ketone, wie sie auch unter GC-Bedingungen aus Alkylketendimeren (AKD) einem synthetischen Leimungsmittel, das zur Hydrophobierung von Papieren eingesetzt wird, entstehen. Diese Ketone entstehen vermutlich durch CO₂- und H₂O-Abspaltung aus jeweils zwei Fettsäuremolekülen und tragen die Ketogruppe an der Verknüpfungsstelle in der Mitte der gebildeten Ketonverbindungen. Im Zusammenhang mit früheren Arbeiten zu AKDs (Odermatt et al. 2003), ist bekannt, dass diese Ketone bei Temperaturen über 250°C auch aus Ca-Stearat entstehen können. Gezeigt wurde dies nur für das Calciumsalz der Stearinsäure (Octadecansäure). Es ist aber anzunehmen, dass sich die Calciumsalze der anderen Fettsäuren vergleichbar verhalten. Die Ketonbildung tritt nicht auf bei Stearinsäure. Jetzt wurden in den Extrakten von *Gonystylus spp.*-Zellstoffen große Mengen dieser Fettsäuren gefunden, s. z. B. Abbildung 5. Zudem wurden alle Zellstoffe in einer alkalischen P-Stufe endgebleicht. Die noch vorhandenen Fettsäuren liegen daher noch dissoziiert vor, also in Form ihrer Salze. Da das zum Waschen der Zellstoffe verwendete Leitungswasser Ca-Ionen enthält, liegen die Stearinsäure entsprechend als Ca-Stearat vor.

Trotz dieser Schwierigkeiten wurde auch in diesem Untersuchungsabschnitt (874) eine Markerverbindung gefunden, die eine Kalibrierkurve mit einem akzeptablen Bestimmtheitsmaß ergibt.

Die Massenspuren $m/z=276$ und $m/z=290$ sind im Massenspektrum einer nicht identifizierten Substanz enthalten, die bei 64,7 min im Chromatogramm des Petroleterextrakts von *Gonystylus spp.* eluiert.

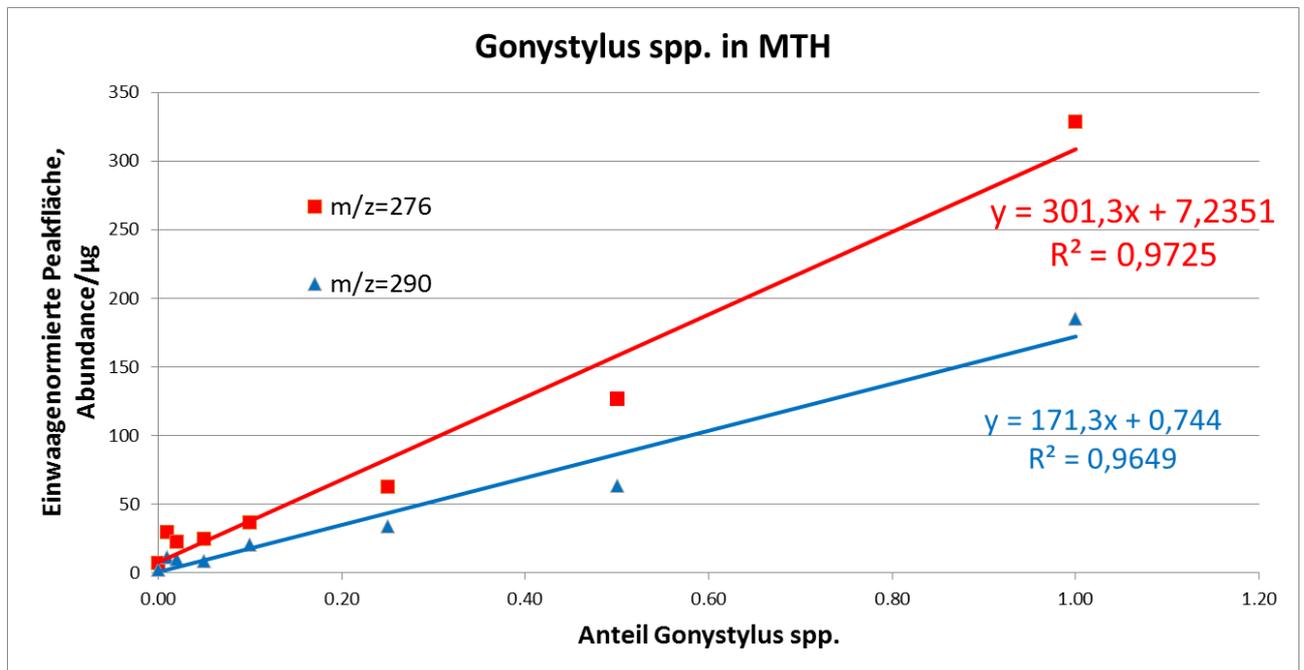


Abbildung 23: MTH mit unterschiedlichen *Gonystylus*anteilen – mit einer nicht identifizierter Substanz bei $RT=64,7$ min

4.4.2.3. MTH versus *Gonystylus spp.* (849-3A)

Da die Ergebnisse zwischen den Teiluntersuchungen zur Quantifizierung von *Gonystylus spp.* in MTH bisher nur schwer übertragbar sind, wurde eine weitere Serie an Zellstoffmischungen hergestellt (Untersuchungsnummer 936), bei denen wieder definierte Mengen eines sortenreinen *Gonystylus*-Zellstoffs mit MTH-Zellstoff vermischt wurden. Da die bisher genutzten Zellstoff-Chargen aufgebraucht waren, wurde wieder eine neue Charge sortenreines *Gonystylus spp.*-Zellstoffs (849-3A) für diese Probenserie verwendet.

Für die Markersuche wurde in diesem Fall eine hausinterne Software eingesetzt, die systematisch spezifische Massenspuren eines Additivs im Vergleich zu einer Matrix sucht. Diese Massenspuren wurden durch manuell hinzugefügte Massenspuren ergänzt. Es ergab sich eine ca. 50 Massenspuren umfassende Liste (s. Anhang, Abbildung 50). Das Markerpotential der Massenspuren wurde in zwei Kalibriereserien gemessen (Tabelle 8). Die Kalibrierkurven wurden umfassend, aber auch getrennt nach Kalibriereserie und Kalibrierbereich ausgewertet. Die Pfeilsymbole indizieren die Güte der jeweiligen Kalibrierung.

Die Abbildung 24 zeigt die einzige Massenspur (9/98), die über den gesamten Kalibrierbereich (0-100%), ein akzeptables Bestimmtheitsmaß erreicht. Dies gelang allerdings nur für eine der beiden gemessenen Kalibriereserien. Für die verschiedenen Kalibrierbereiche 0-10% und 10-100% lassen sich ebenfalls geeignete Massenspuren finden. Beispiele für den besonders interessanten Bereich von 0-

10% sind in Abbildung 25 dargestellt. In diesen beiden Fällen wurden die guten Bestimmtheitsmaße nur jeweils in der ersten Kalibrierreihe erhalten, während in der zweiten Kalibrierreihe und bei höheren *Gonystylus* spp.-Gehalten die Bestimmtheitsmaße ungenügend waren.

Insbesondere die Unterschiede zwischen den Serien der Teiluntersuchung 936 lassen vermuten, dass vielleicht ein Zeitfaktor Einfluss auf die Ergebnisse ausübt. So ist vorstellbar, dass die Lagerzeit und die Lagerbedingungen der Extrakte bis zur chromatographischen Analyse sowie die Zeit zwischen der Vorbereitung der Analysenproben bis zum Start der chromatographischen Trennung einen Einfluss auf die gemessenen Extraktstoffzusammensetzungen haben können. Diesen Faktoren werden aktuell in einer Paralleluntersuchung geprüft.

Tabelle 8: Ausschnitt der Auswertetabelle für Untersuchungsabschnitt 936

			ID	1	101	2	3	7	9
			lon	99	58	109	58	68	98
			Ret-Zeit	8.35	8.35	9.74	9.74	9.96	9.97
Datensatz	Einwaage	Massenanteil	Info	1/99 nFI	101/58 nFI	2/109 nFI	3/58 nFI	7/68 nFI	9/98 nFI
OP50328.D	90.6	0	LH936-1-P	144	641	51	40	52	44
OP50329.D	92.8	5	LH936-4-P	474	2338	258	122	273	114
OP50330.D	90.7	1	LH936-2-P	313	1420	227	133	240	93
OP50331.D	92.4	10	AW936-9-P	555	2667	303	113	334	155
OP50332.D	89.9	2	LH936-3-P	207	912	80	47	89	47
OP50333.D	91.5	50	LH936-6-P	813	3861	623	279	531	185
OP50334.D	89.2	100	AW936-8-P	788	3638	314	193	280	209
OP50335.D	92.3	25	LH936-5-P	566	2583	454	228	405	164
OP50336.D	91.6	75	AW936-7-P	690	3233	541	214	572	254
OP50337.D	91.7	0	LH936-1-P	493	2238	163	87	132	109
OP50338.D	92.2	5	LH936-4-P	741	3416	326	141	344	174
OP50339.D	91.4	1	LH936-2-P	407	1871	272	133	268	127
OP50340.D	90.3	10	AW936-9-P	675	3299	509	227	489	166
OP50341.D	90.5	2	LH936-3-P	370	1641	121	76	107	77
OP50342.D	93.4	50	LH936-6-P	1315	6342	561	296	636	300
OP50343.D	92.1	100	AW936-8-P	1626	7404	1278	499	1288	540
OP50344.D	92.1	25	LH936-5-P	441	2002	139	83	169	97
OP50345.D	92.1	75	AW936-7-P	1488	6704	721	260	797	414
Kal 1			m	5.37	24.90	3.15	1.49	2.76	1.65
			b	345.71	1624.29	223.11	107.85	226.39	91.55
			r ²	0.665	0.630	0.358	0.448	0.332	0.714
Kal 2			m	12.62	57.42	9.07	3.29	9.70	4.18
			b	463.70	2169.91	184.40	102.21	181.14	98.06
Bestimmtheitsmaße			r ²	0.873	0.850	0.808	0.773	0.857	0.918
↑	1.00	↑	0.90						
↔	0.89	↔	0.80						
↔	0.79	↔	0.70						
↓	0.67	↓	0.00						
Kal 1 + Kal 2			m	9.00	41.16	6.11	2.39	6.23	2.92
			b	404.70	1897.10	203.76	105.03	203.76	94.80
			r ²	0.595	0.583	0.544	0.573	0.541	0.663

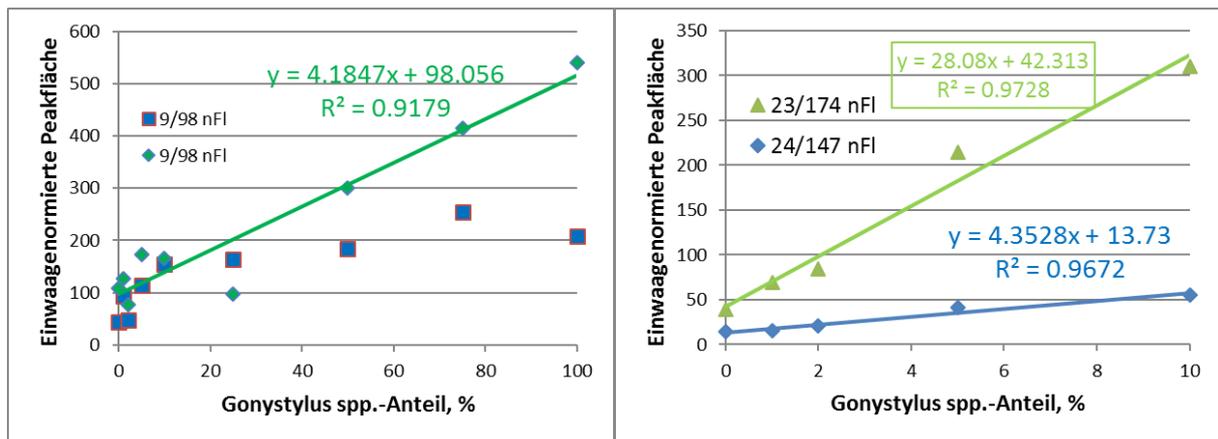


Abbildung 24: m/z=98 (ID=9) zur Quantifizierung von *Gonystylus spp.* in MTH – 0-100%

Abbildung 25: m/z=174 (ID=23) und m/z=147 (ID=24) zur Quantifizierung von *Gonystylus spp.* in MTH – 0-10%

4.4.2.4. Fazit - MTH versus *Gonystylus*:

Die Untersuchung zur Variabilität verdeutlichte, dass sich die Extrakte verschiedener *Gonystylus spp.* Chargen klar unterscheiden, s. Kap. 4.7.1.2. Die verschiedenen Ansätze, eindeutige Marker für *Gonystylus spp.* zu finden, s. 4.2.1.1, 4.2.1.2 und 4.4.2.3, zeigen, dass unter spezifischen Bedingungen, also bestimmten Kombinationen aus Charge / Probenvorbereitung und Extraktion, solche *Gonystylus spp.* spezifische Marker gefunden werden können. Diese lassen Identifizierungen und evtl. sogar Quantifizierungen im Bereich einstelliger Massenanteilen möglich erscheinen.

Weitere Untersuchungen müssen jedoch zeigen, unter welchen Bedingungen die jeweiligen Marker valide eingesetzt werden können. Diese Abhängigkeiten, insbesondere von der *Gonystylus spp.*-Charge, ermöglichen vielleicht sogar die Identifizierung einzelner Arten aus der Gattung *Gonystylus*. Um zuerst nur die Gattung *Gonystylus spp.* chemotaxonomisch zu identifizieren oder gar zu quantifizieren müssen diese Abhängigkeiten geklärt und abgegrenzt werden von natürlichen Schwankungen in der Extraktstoffzusammensetzung innerhalb der Gattung und den jeweiligen Arten oder Artengruppen. Dies bedeutet leider eine Verzögerung auf dem Weg zu einem verlässlichen chemotaxonomischen Nachweis.

Die Möglichkeit, weitere Aussagen zu erhalten liegen in der bisher nur ungenügenden Auflösung der in den Chromatogrammen auftretenden „UCMs“, s. Abbildung 5. Für die Erzielung einer besseren Auflösung stehen verschiedene Techniken zur Verfügung:

- Die Verwendung weiterer Extraktionsmittel. Da in den ersten Messungen zur Chemotaxonomie die hydrophoberen Extrakte vielversprechender erschienen und auch davon ausgegangen werden muss, dass unter den intensiven, polaren Extraktionsbedingungen bei der Zellstoffherstellung vornehmlich hydrophobe Holzinhaltsstoffe erhalten bleiben, wurden die teilweise schon vorliegenden Acetonextrakte noch nicht in der gleichen Ausführlichkeit ausgewertet wie dies für die Petroletherextrakte erfolgte.
- Durch Vorfraktionierung, z. B. mittels SPE, wie sie auch schon in ersten Versuchen an den Zellstoffextrakten durchgeführt wurde, s. Kap. 4.2.2, kann die Zusammensetzung der UCMs

vereinfacht werden, wodurch die nachfolgende Chromatographie bessere Trennergebnisse liefert.

- Die Verwendung von Derivatisierungsmitteln, insb. auch in Kombination mit den beiden oben genannten Punkte besitzt gleichfalls Verbesserungspotential im Sinne einer verbesserten Auflösung.
- GCxGC ist bewährt bei der verbesserten Auflösung von UCMs im Bereich der Mineralölanalytik und hat seine Leistungsfähigkeit in ersten Messungen an Zellstoffextrakten schon angedeutet. Insbesondere die Kombination mit HR(hochauflösenden)MS-Techniken, am besten durch eine direkte Kopplung, ist sehr vielversprechend
- Interessant dürfte auch sein, ob die Empfindlichkeit der DRIFT-Technik (McClure et al. 2015), die sehr erfolgreich zur Identifizierung von Holzarten eingesetzt wird, zur Charakterisierung von Zellstoffextrakten eingesetzt werden kann.

4.5. Lichtmikroskopische Untersuchung an neu aufgenommenen Arten (AP 5)

Im Rahmen des Arbeitspakets 5 wurden die diagnostischen Strukturmerkmale der Gefäßelemente für die Hölzer der neu ausgewählten zehn Gattungen anhand der mazerierten, isolierten Gefäßelemente untersucht und ihre quantitativen Merkmale histometrisch bestimmt.

Von den Hölzern der ausgewählten Gattungen wurden dafür aus Mazeraten gefärbte Dauerpräparate erstellt und im Anschluss lichtmikroskopische Bilder von jeweils mindestens 36 Gefäßelementen aufgenommen. Die Bilder der Gefäßelemente wurden auf ihre qualitativen Merkmale hin untersucht und systematisch ausgewertet. Dies beinhaltet die Beschreibung der Form der Gefäßelemente und des Fortsatzes, die Art der Gefäßdurchbrechung, das Vorhandensein von Thyllen sowie die Anordnung und Form der Gefäß- und Kreuzungsfeldtüpfel.

Für jede der 38 Gattung/Untergattungen des gesamten Projekts wurde eine Bildtafel mit ausgewählten Gefäßelementen erstellt, um die natürliche Variationsbreite der Gefäßelemente einer Gattung zu dokumentieren. Die Auswahl ermöglicht einen Überblick über die Ausprägung der qualitativen Merkmale (v.a. Art und Größe der Tüpfel), die der Identifizierung dienen (**Abbildung 26**).

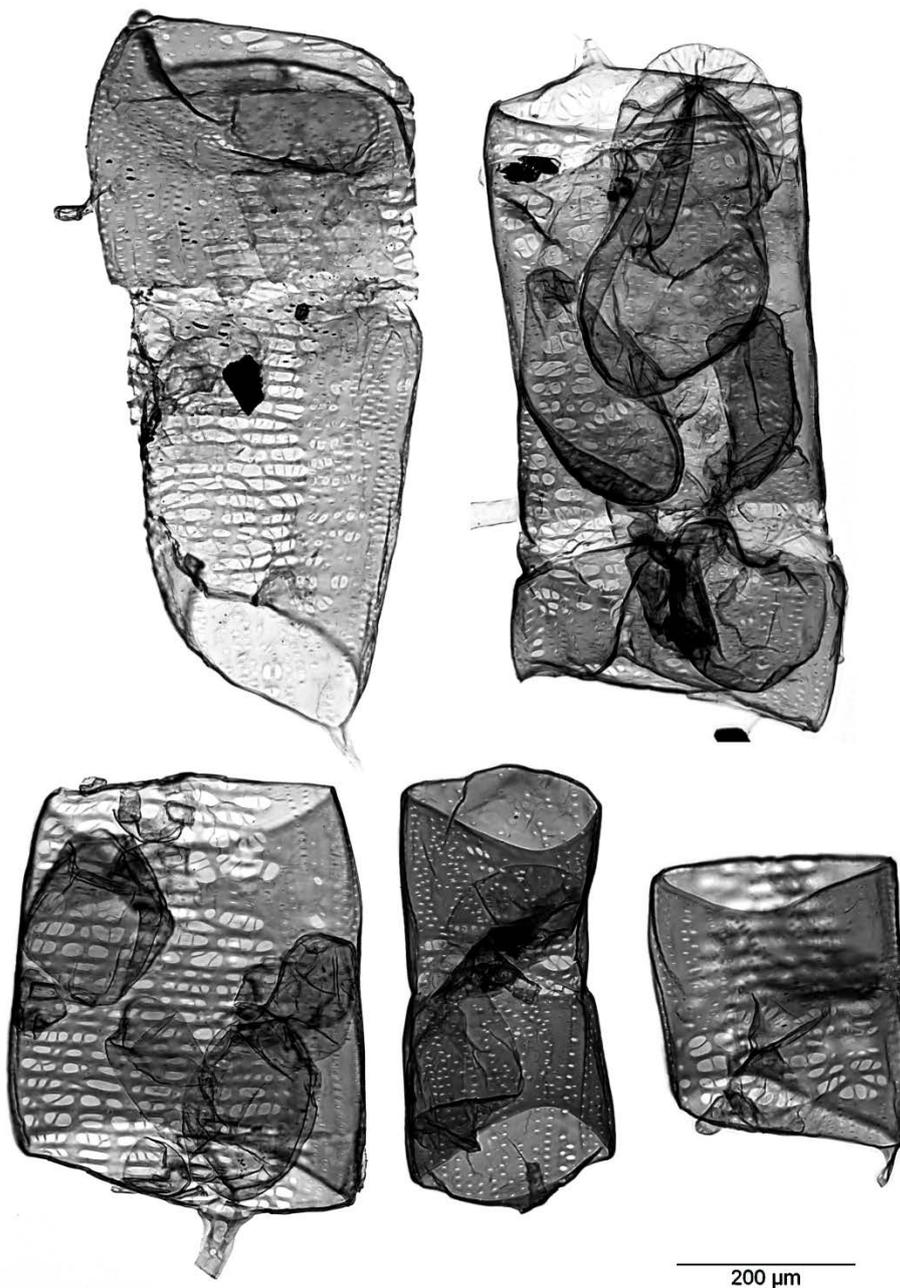


Abbildung 26: Bildtafel von Gefäßelementen der Holzart *Castanopsis argentea*

Die Gefäßelemente wurden wie in Abbildung 27 dargestellt vermessen (Länge, zweimal der Durchmesser, Hof- und Aperturdurchmesser der Gefäßstüpfel in axialer Richtung).

Neu aufgenommen in die quantitative Merkmalsliste wurde die Gefäßstüpfelhofgröße. Im ersten Projektzeitraum konnten die Höfe nicht vermessen werden, da in den mit Safranin gefärbten Proben die Höfe nicht klar erkennbar waren. Schon für die Holzartenidentifizierung am Holz konnte gezeigt werden, dass die Größe der Gefäßstüpfelhöfe ein aussagekräftiges Merkmal darstellt (Richter und Dallwitz, 2000). Während die Größe der Apertur der Gefäßstüpfel nicht zur Identifizierung verwendet wird und folglich bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde. Im zweiten Projektzeitraum wurde

deshalb nach geeigneten Färbemethoden gesucht, mit denen der Hof klar erkennbar wird. Alle 38 Mazerate wurden dann zusätzlich mit Nigrosin und mit der Alexander-Herzberg-Färbung angefärbt. Die Alexander-Herzberg-Färbung kann zwar nicht konserviert werden, ermöglicht aber eine besonders deutliche Differenzierung von Hof und Apertur. Die Erfassung von Hof- und Aperturdurchmesser der Gefäßtüpfel stellt eine entscheidende Verbesserung der Daten im Vergleich zur Vorgängerstudie dar.

Die Ergebnisse der Vermessung des Durchmessers der Kreuzungsfeldtüpfelapertur im Vorgängerprojekt erwiesen sich aufgrund ihrer Variationsbreite als unzureichend aussagekräftig für die Holzartenidentifizierung. Daher wurde in diesem Projekt auf ihre Erhebung verzichtet.

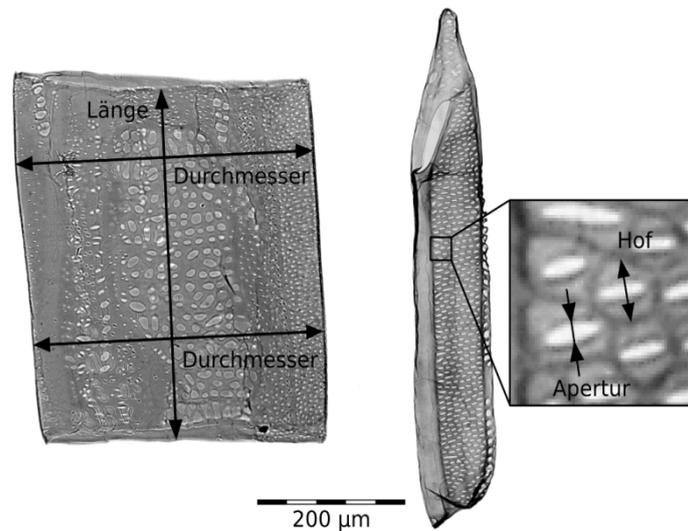


Abbildung 27: Darstellung und Datenerhebung der quantitativen Merkmale durch Vermessen der Länge und des Durchmessers der Gefäßelemente sowie der Gefäßtüpfelapertur und des -hofs (am Beispiel von *Shorea* subg. *Rubroshorea* (linke Abbildung) und *Canarium* cf. *littorale* (rechte Abbildung))

Zum Abschluss des Projekts wurden die grundlegenden Arbeiten zur Charakterisierung der anatomischen Strukturmerkmale in Form eines umfangreichen, 108 Seiten umfassenden Gefäßatlas mit dem Titel „Atlas of vessel elements – identification of Asian timbers“ ausgearbeitet, beim IAWA Journal zur Veröffentlichung eingereicht und von den Gutachtern akzeptiert. Der Gefäßatlas wird Anfang 2018 online und in gedruckter Form im IAWA Journal 39 (3) veröffentlicht.

Im „Atlas of vessel elements“ wird einführend beschrieben, anhand welcher Merkmale die untersuchten Hölzer an ihren Gefäßen in Faserstoffen wie Papier und Faserplatten diagnostiziert werden. Die Beschreibungen der einzelnen Gattungen/Untergattungen sind für eine einfachere Orientierung in vier Gruppen mit grob ähnlichen Strukturmerkmalen unterteilt. Jede Gattung wird auf einer Veröffentlichungsseite detailliert beschrieben (**Abbildung 28**). Klar strukturiert sind alle morphologischen Merkmale aufgelistet (z.B. Art der Gefäßelementenddurchbrechung, Form des Gefäßelementes und des Fortsatzes, Anordnung und Erscheinungsbild der verschiedenen Tüpfel und Messwerte der Gefäßelemente und deren Gefäßtüpfel). Des Weiteren werden wichtige Informationen zu Handelsnamen, geographischen Verbreitungsgebieten und der DIN EN 13556-2003 Code aufgelistet. Auf der jeweils gegenüberliegenden Seite zeigt eine Bildtafel vier bis zehn repräsentative

Gefäßelemente zum Vergleich der natürlichen Variationsbreite in standardisierter Vergrößerung (**Abbildung 28**). Neben den beschriebenen Strukturmerkmalen, sind die Form der verschiedenen Tüpfel, ihre Anordnung und Ausrichtung für die Gattungen sehr charakteristisch. Die hochwertigen mikroskopischen Aufnahmen stellen daher eine grundlegende Referenz für die Charakterisierung und Bestimmung der individuellen Gefäßelemente dar. Der genaue Abgleich einer unbekanntenen Probe mit den Abbildungen ist deshalb essentiell für eine Identifizierung. Aus diesem Grund wurde auf die Qualität und Aussagekraft der Abbildungen besonderer Wert gelegt. Dies wurde auch von den Gutachtern des IAWA Journals bestätigt.

Atlas of vessel elements

Palaquium sp. (Sapotaceae)

Trade names: Nyatoh (MY, ID, DE); chay (VN); pencil cedar, red planchonella (PG); pali (IN); nato (PH); kha-nunnok (TH); riam jangkka (MY-sar); hangkang, balam teruing puteh, balam masin, kayu tanjung hutan, mayang, taban (MY, ID); moordooke (AU).

DIN EN 13556:2003 code: PPXX.

CITES regulations: not protected.

Geographic distribution: India, Sri Lanka, South China, Indochina, Indomalaysia and Pacific Islands.

Vessel elements: large (length about 690 µm, width 290 µm); elongated: those with a smaller diameter are tube-shaped; those with a larger diameter are barrel-shaped.

Tails: short to very long, with gradual transition.

Perforation plates: simple or very rarely scalariform (with 3-10 bars, Richter and Dallwitz 2000); extending over the entire lumen; inclined; few positioned laterally.

Intervessel pits: regularly present; alternate; vertical diameter 3-5-8 µm; large areas with numerous intervessel pits; apertures circular to oval.

Vessel-ray pits: VAS; in two size classes: larger ones mostly elongated, in groups of 4-8 pits per ray cell (**arrow**); smaller ones similar to intervessel pits, cross-fields with 3-5 pit rows; apertures oval.

Areas without any pits: regularly present; large to very large.

Tyloses: present.

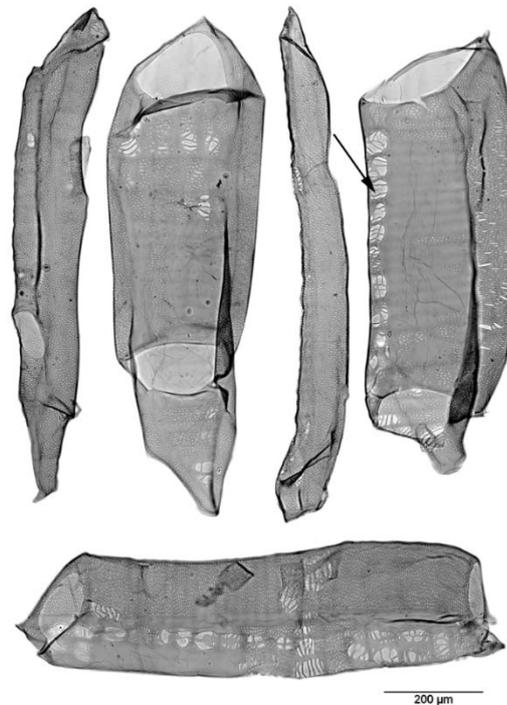
Helical thickenings: absent.

Quantitative data:

Vessel elements (434-) 691 (-846) µm long, and (132-) 292 (-406) µm wide; l/w ratio 2.4.

Intervessel pit borders (3.1-) 4.9 (-7.8) µm in vertical diameter; pit apertures (0.6-) 1.2 (-2.0) µm.

Fibers 1900 µm long, 27.5 µm wide. Fiber wall thickness 6.6 µm (weighted averages).



89

200 µm

Abbildung 28: Darstellung der Referenzen im „Atlas of vessel elements“ am Beispiel von *Palaquium* sp.

Mit dem IAWA Journal wird der Atlas in der international anerkanntesten, englischsprachigen Zeitschrift für Holzanatomie veröffentlicht. Die Publikation als im Internet frei zugängliche Version ermöglicht es allen Prüfinstituten weltweit, die Referenzen für die Überprüfung von Papier und Faserplatten anzuwenden. Der Atlas ist damit eine direkte Unterstützung bei der Überprüfung der Holzquellen für den internationalen Papierhandel.

4.6. Elektronenmikroskopische Untersuchung (FE-SEM) (AP 6)

Die im vorliegenden Bericht unter Kap. 4.5, 4.7.2 und 4.8.1 beschriebenen Strukturmerkmale sind als „diagnostische“ Merkmale international etabliert und von der IAWA in Form einer Merkmalsliste veröffentlicht (IAWA Committee, 1989), die als Grundlage für die anatomische Bestimmung von individuellen Arten, Gattungen oder Familien dient. Da die Kombination dieser Strukturmerkmale für die Identifizierung des Holzgewebes in den drei anatomischen Richtungen (transversal, radial und tangential) angewendet wird, bleiben nur wenige Merkmale, die an den vereinzelt Gefäßelementen eines Papiers analysiert werden können. Um die Genauigkeit der Beschreibung der untersuchten Referenzen zu erhöhen und damit die Identifizierung über die Anatomie zu vereinfachen bzw. zu verbessern, wurden ergänzende Untersuchungen der Referenzen mit dem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (FE-SEM) bei wesentlich höherer Auflösung durchgeführt, um einzelne Strukturmerkmale besser darstellen oder für eine diagnostische Differenzierung nutzen zu können.

Zunächst wurden von 35 Gattungen isolierte Gefäßelemente aus mazeriertem Referenzmaterial und für insgesamt 28 Gattungen/Untergattungen auch aus dem Zellstoff für die Untersuchung im FE-SEM präpariert. Von 28 Gattungen/Untergattungen wurden von den Mazerat- und Zellstoffproben standardisierte Übersichts- und Detailaufnahmen angefertigt. Da die Gefäßelemente im Mazerat wesentlich besser erhalten sind (**Abbildung 29**, links), können an diesen Proben alle Details der charakteristischen Strukturmerkmale am besten untersucht werden. Der Vergleich mit den Gefäßelementen des Zellstoffs ist von großer Bedeutung, um abschätzen zu können, welche Merkmale an den Gefäßelementen des Zellstoffs durch die starken chemischen und mechanischen Einwirkungen bei der Zellstoffherstellung beeinträchtigt bzw. verändert werden (**Abbildung 29**, rechts).

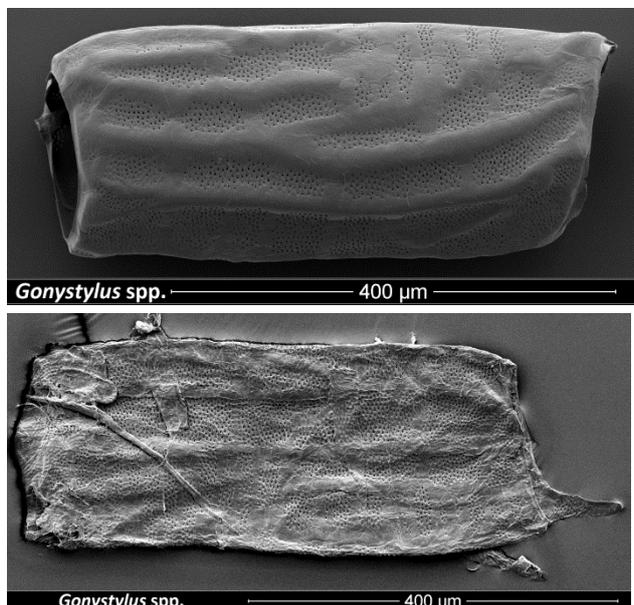


Abbildung 29: Übersichtsaufnahmen der Gefäßelemente von *Gonystylus*. Links: Mazerat; Rechts: Zellstoff

Die Ergebnisse der FE-SEM-Analysen zeigen, dass mit Hilfe der hochauflösenden Technik zusätzliche bzw. besser abgrenzbare Strukturmerkmale identifiziert werden können. Ein Beispiel sind die Ränder an den Gefäßenddurchbrechungen isolierter Gefäßelemente. Je nach Gattung liegt ein breiter, schmaler oder kein nach innen liegender Rand vor. Zum Teil kann ein solcher Rand auch Tüpfel aufweisen (**Abbildung 30**).

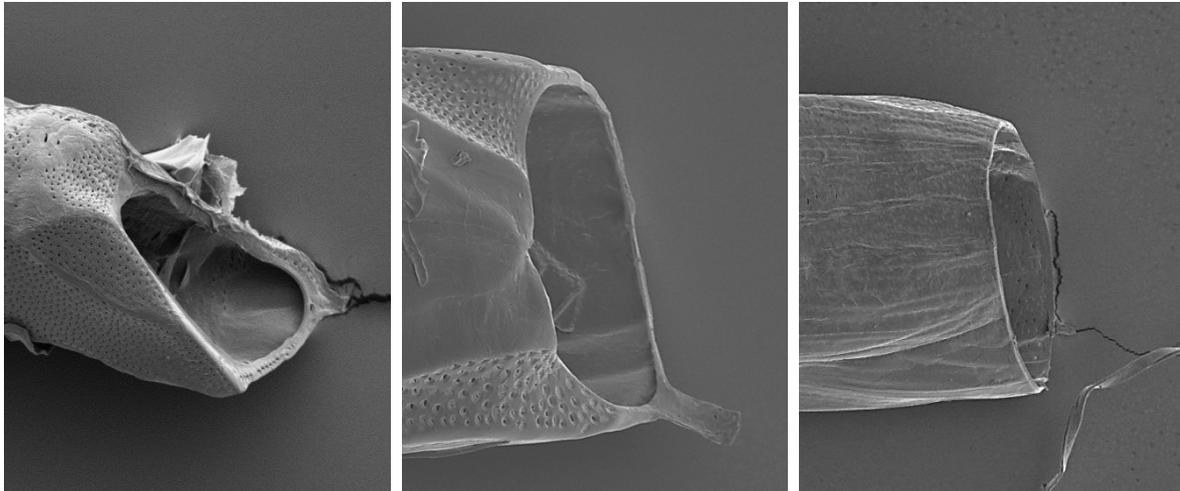


Abbildung 30: Gefäßelemente mit unterschiedlichen Rändern der Gefäßelementenddurchbrechung

Links: Gefäßelementenddurchbrechung mit breitem, nach innen liegendem Rand mit Tüpfeln der Gattung *Palaquium*; Mitte: Gefäßelementenddurchbrechung mit schmalen, nach innen liegendem Rand der Gattung *Shorea* subg. *Rubroshorea*; Rechts: Gefäßelementenddurchbrechung ohne Rand der Gattung *Dipterocapus*

Zusätzliche diagnostische Informationen über die Tüpfel können aus der Gefäßinnenansicht abgeleitet werden. Schon im Vorfeld der Studie war bekannt, dass die innere Apertur der Tüpfel zum Teil rund, schlitzförmig oder auch erweitert sein kann (eine mehrere Tüpfel einschließende innere Einkerbung der Zellwand) (**Abbildung 31**). Diese erweiterte innere Apertur ist z.B. bei der Art *Tetramerista glabra* so stark ausgeprägt, dass sie auch im Lichtmikroskop problemlos sichtbar ist. Das Vorkommen dieses speziellen Strukturmerkmals wurde nachträglich an belegten Schnittpräparaten aus der wissenschaftlichen Holzsammlung des Thünen-Instituts überprüft und konnte für alle vier dokumentierten Präparate der Art *Tetramerista glabra* eindeutig bestätigt werden. Es ist deshalb ein geeignetes Strukturmerkmal, das in die von der IAWA ausgeführten Merkmaliste für die Holzartenbestimmung aufgenommen werden sollte und auch für die anatomische Beschreibung von anderen Gattungen angewendet werden kann.

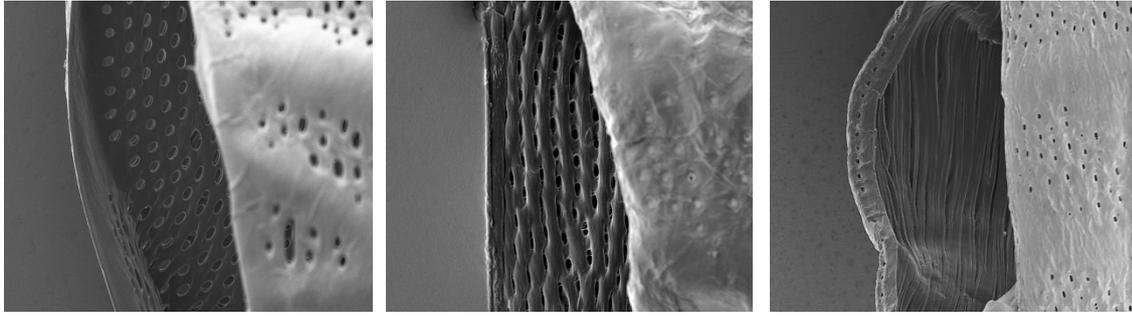


Abbildung 31: Gefäßinnenansicht mit ovaler Tüpfelform der Gattung *Durio* (links), mit ovalen Tüpfeln mit schlitzartiger, erweiterter Apertur der Art *Albizia procera* (Mitte) und mit lamellenartiger, erweiterter Apertur der Gattung *Heritiera* (rechts)

Neben den qualitativen Merkmalen konnten die quantitativen Merkmale wesentlich genauer vermessen werden. Dies gilt vor allem für die Höfe und Aperturen der Tüpfel.

4.7. Evaluierung der natürlichen Variabilität auf Gattungsebene (AP 7)

Die natürliche Variabilität wurde beispielhaft an zwei Gattungen untersucht, an *Rubroshorea* und *Gonystylus*. Diese beiden Gattungen wurden gewählt, weil die Baumarten aus der Familie der *Dipterocarpaceae*, zu der die Untergattung *Rubroshorea* gehört, mit ca. 200 Arten sehr vielfältig ist und die am häufigsten vorkommende Baumartenfamilie Südostasiens darstellt. *Gonystylus spp.* wurde aufgrund des besonderen Schutzstatus gewählt. Die für diese Untersuchung zur Verfügung stehenden Proben sind in Tabelle 1 gelistet.

4.7.1. Chemotaxonomie

4.7.1.1. Rubroshorea

Es lagen 14 Proben aus 7 verschiedenen Regionen Süd-Ostasiens vor (Abbildung 32). Aus jeder Region wurden je zwei Proben zu gebleichten Zellstoffe verarbeitet. Diese Zellstoffe wurden nach der in AP 2 optimierten Methoden extrahiert und jeder Extrakt wurde nach der ebenfalls in AP 2 optimierten TD-GC/MS Methode als Vierfachbestimmung analysiert.



Abbildung 32: Herkunft der untersuchten Rubroshoreaproben

Ein Chromatogramm aus dieser Messserie ist in Abbildung 33 beispielhaft aufgeführt.

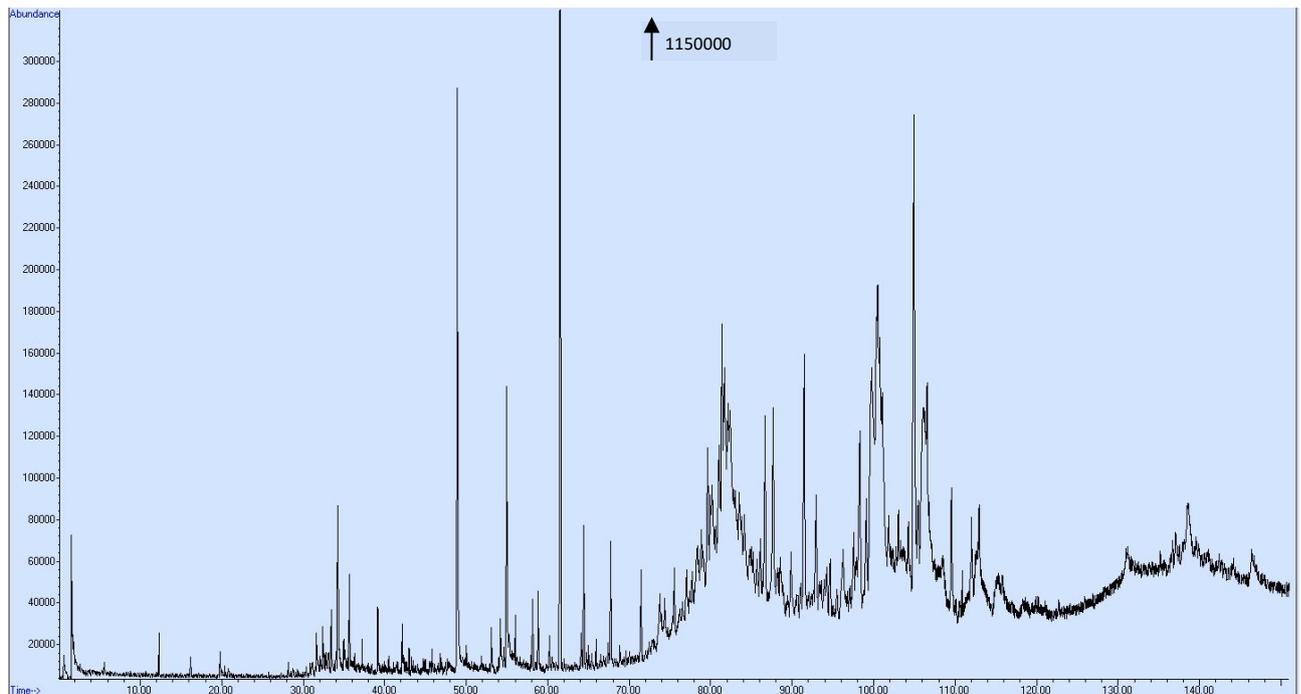


Abbildung 33: Petrolether Extrakt von Rubroshorea - Central Kalimantan (OP49378)

Eine für die Charakterisierung der Proben geeignete Ionenliste wurde durch die folgende Datenbehandlung erhalten: Anhand eines Overlays der Vierfachbestimmungen wurde manuell jeweils ein für jede Probe repräsentativer GC/MS-Datensatz ausgewählt. Aus jedem dieser für die Proben repräsentativen Chromatogramme wurden die mindestens 100 größten Peaks ermittelt sowie eine repräsentative Massenspur für den jeweiligen Peak ausgewählt. Die resultierenden Peaktabellen wurden miteinander verglichen und die mehrfach vorkommenden Massenspuren wurden aussortiert. Die entstandene 601 m/z umfassende Ionenliste wurde überarbeitet, indem nur Massenspuren mit einer Mindestpeakfläche >10000 weiterverwendet wurden. Die nunmehr nur noch 135 m/z umfassende Ionenliste wurde noch weiter manuell selektiert. Hieraus resultierte eine nur noch 60 Massenspuren umfassende Ionenliste. Diese Ionenliste wurde genutzt, um die Integrationsparameter für die Integration im EIC (extracted ion chromatogram)-Modus zu optimieren. Es waren zwei verschiedene Sätze an Integrationsparametern nötig, um die relativ stark verrauschten Signale verlässlich zu erfassen sowie Schwankungen der Retentionszeiten zu kompensieren.

Mit den angepassten Integrationsparametern und der erarbeiteten Ionenlisten wurden alle Datensätze ausgewertet, indem die Ionen aus der erarbeiteten Ionenliste in jedem Chromatogramm integriert wurden. Die entstehende, 56x60 Elemente umfassende Datentabelle (56 Objekte (Proben) und 60 Variablen (Massenspuren)) wurde mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA-principal component analysis) ausgewertet.

Nachdem die Proben sortiert, Ausreißer identifiziert und entfernt, sowie Fehler der automatischen Integration manuell korrigiert wurden, konnten die in Abbildung 34 dargestellten systematischen Unterschiede zwischen den Proben im score plot erkannt werden.

Extrakte aus Rubroshorea-Zellstoffen unterschiedlicher Herkunft
 Nach Entfernen von Ausreißern (Sam. 1a, 6a und der dominanten Var. 29 37/97 bei 79,31 min)
 PC1 vs PC2

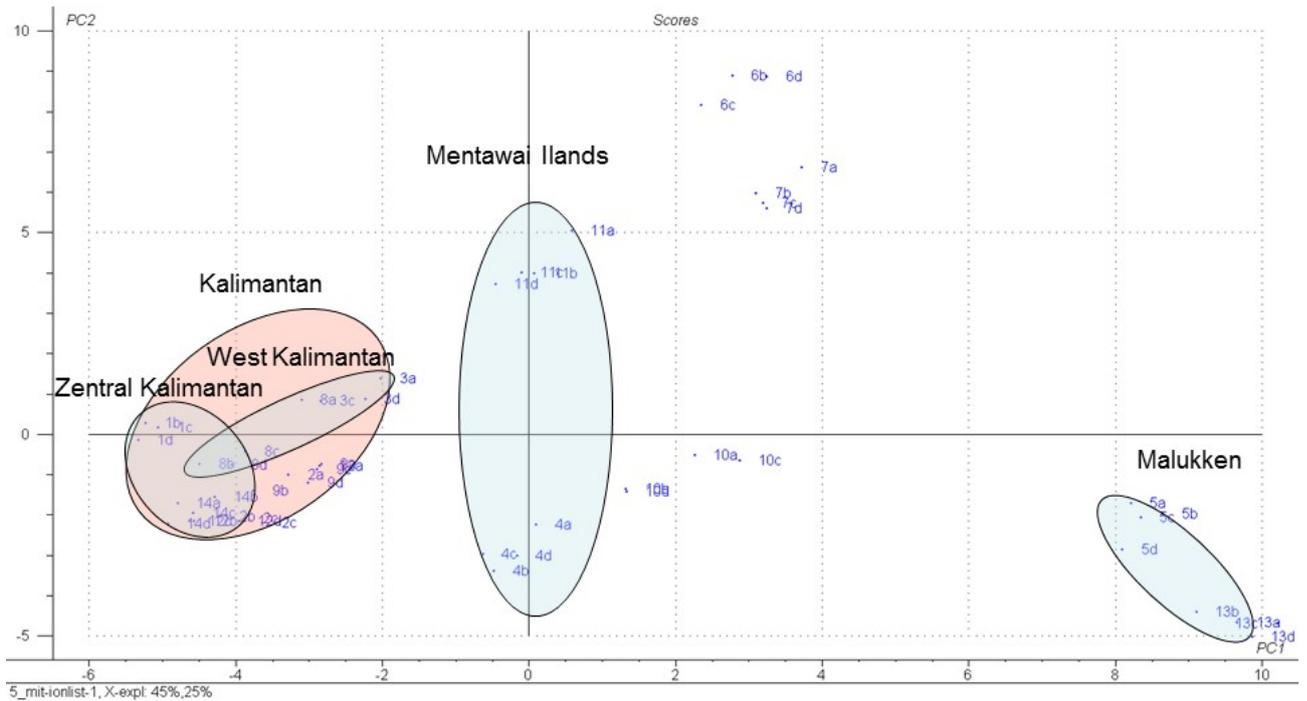


Abbildung 34: PC1 vs PC2 aus PCA – Rubroshorea unterschiedlicher Herkünfte

Durch PC1 und PC2 werden 34% und 25 % der Streuung im Datensatz erfasst. Alle aus Kalimantan stammenden Proben werden als eigene Gruppe von allen anderen Proben unterschieden. Das gleiche gilt für die beiden Proben von den Mentawai Ilands sowie den Molukken. Die drei Gruppen werden vornehmlich entlang PC1 voneinander getrennt. Keine klare Gruppierung ergibt sich für die Proben aus Sabah und den malayischen Inseln.

Zwar repräsentiert PC5 nur noch 6% der Streuung im Datensatz. Wenn jetzt allerdings PC1 vs. PC5 betrachtet wird (Abbildung 35), ergeben auch die beiden Proben aus West Malaysia eine eigene Gruppe. Lediglich die beiden Proben aus Sabah (7 und 12) können nicht als eigene Gruppe von den anderen Proben abgegrenzt werden. Probe 12 liegt mitten zwischen den Proben aus Kalimantan.

Diese Gruppierung der Proben entsprechend ihrer Herkunft im score plot bedeutet, dass die Extraktstoffzusammensetzung der Proben unterschiedlicher Herkünfte sich systematisch voneinander unterscheiden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die systematischen Unterschiede, die durch die Abstände der Gruppen zueinander im Vergleich zu den Streuungen der Wiederholungsmessungen bewertet werden können, relativ klein sind. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind also nicht sehr stark ausgeprägt.

Inwieweit diese ersten Erkenntnisse für reale Identifizierungen genutzt werden können, muss an weiteren Proben verifiziert werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Extrakte sortenreiner Zellstoffe miteinander verglichen. Bei den geringen Unterschieden zwischen den Gruppen ist das Diskriminierungspotential der Vorgehensweise bei Vorliegen von Zellstoffmischungen vermutlich nicht ausreichend. Selbst die Identifizierung sortenreiner Zellstoffe wird vermutlich schwierig, da durch den untersuchten Probenatz die möglichen Variationen innerhalb der jeweiligen Gruppen nicht abgedeckt ist. Durch Betrachtung der „loadings“, der Beiträge der ursprünglichen Variablen auf die Ausrichtung der Hauptkomponenten, können jedoch Hinweise auf geeignete Marker, also gattungsspezifische sekundäre Holzinhaltstoffe, gewonnen werden, die dann wiederum in einem geeigneten Datenbanksatz für Identifizierungen genutzt werden können.

Extrakte aus Rubroshorea-Zellstoffen unterschiedlicher Herkunft
 Nach Entfernen von Ausreißern (Sam. 1a, 6a und der dominanten Var. 29 37/97 bei 79,31 min)
 PC1 vs PC5

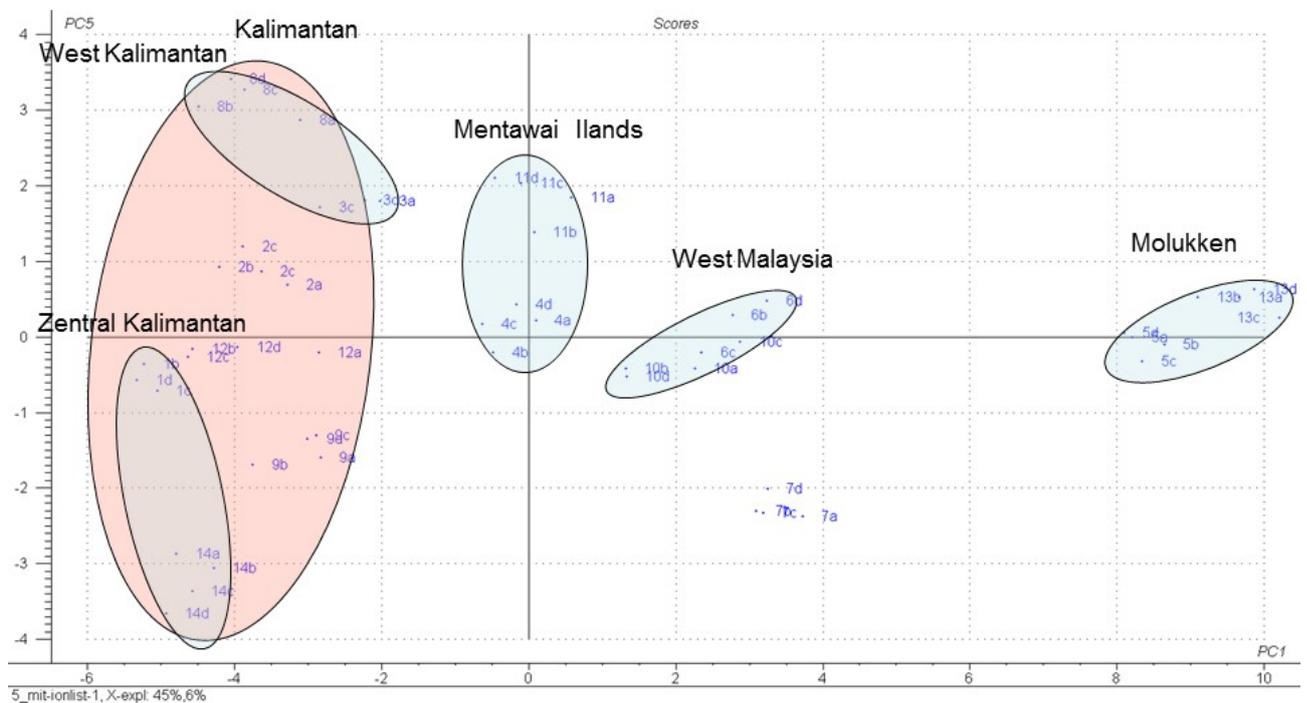


Abbildung 35: PC1 vs PC5 aus PCA – Rubroshorea unterschiedlicher Herkunft

4.7.1.2. *Gonystylus* spp.

Für die Untersuchung der Variabilität innerhalb der Gattung *Gonystylus* spp. lagen 6 Proben vor. Es konnten keine Proben vor Ort gewonnen werden, weshalb auf „Altbestände“ ausgewichen wurde, die in verschiedenen Tischlereien meist als Halbprodukte in Form von Profilleisten vorlagen. Bei den verschiedenen Chargen handelt es sich um Proben aus verschiedenen Lieferungen von vor wenigsten 30 Jahren, also aus Zeiten, in denen *Gonystylus* spp. in großem Maßstab zu meist Profilleisten

verarbeitet wurde. Leider konnten keine weiteren Informationen zu den Proben eruiert werden. Die Gattungszugehörigkeit der verschiedenen *Gonystylus spp.*-Chargen wurden vor der Verarbeitung zu gebleichten Zellstoffen vom Kompetenzzentrum für Holzherkünfte bestätigt.

Diese Zellstoffe wurden nach der in Kap. 4.2 optimierten Methoden extrahiert und jeder Extrakt wurde nach der in 4.3 optimierten TD-GC/MS Methode als Dreifachfachbestimmung analysiert.

In einer im vorherigen Abschnitt A beschrieben, analogen Vorgehensweise wurde auch für die Chromatogramme der *Gonystylus spp.*-Extrakte eine repräsentative Ionenliste ermittelt, die 58 Massenspuren enthielt, woraus sich eine 18x58 große Datentabelle für die PCA ergab.

Der sich aus der PCA ergebende score plot zeigt eine klare Trennung der Proben 3A und 3C von allen anderen *Gonystylus spp.*-Proben. Im Vergleich zu den score plots in Abschnitt A sind die Variationen innerhalb der Mehrfachmessungen deutlich geringer im Vergleich zu den Abständen zwischen den sich ergebenden Gruppen.

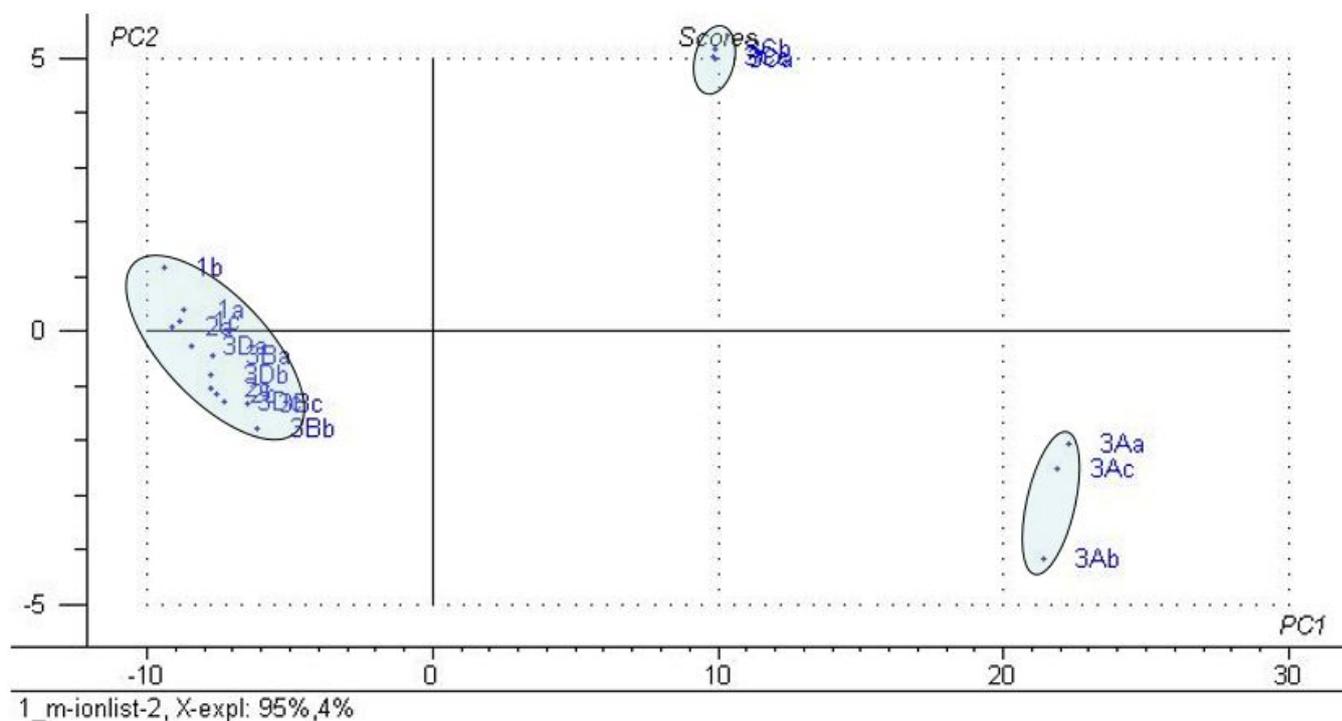


Abbildung 36: PC1 vs. PC2 - unterschiedliche *Gonystylus spp.* Proben

Die Gruppen werden vornehmlich entlang PC1 getrennt, die mit 95% nahezu die gesamte Streuung im Datensatz repräsentiert. PC1 wird wesentlich von zwei Verbindungen (40/129 und 43/149) dominiert (Abbildung 37), die unter den verwendeten Extraktionsbedingungen in hohen Anteilen in den Extrakten gefunden werden.

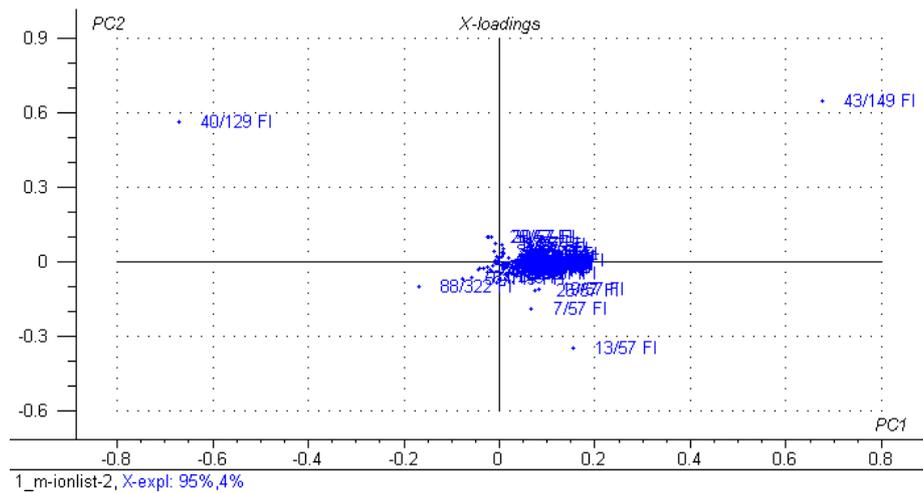


Abbildung 37: Loadings für PC1 und PC2 - unterschiedliche *Gonystylus spp.* Proben

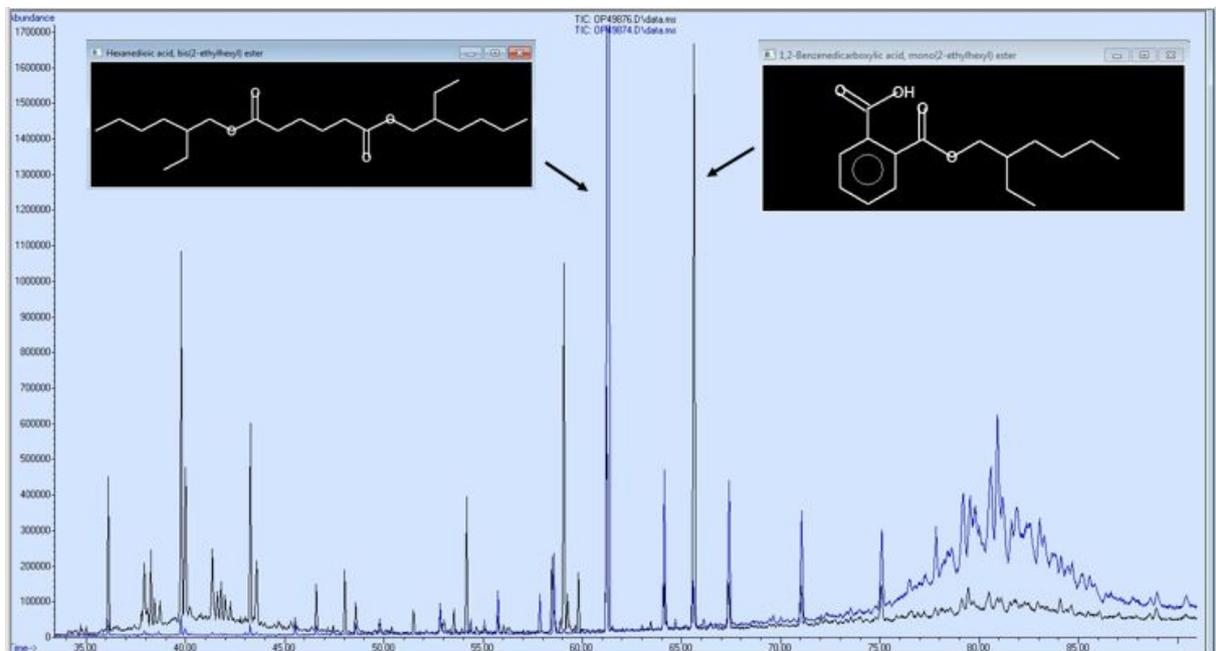


Abbildung 38: PC1 dominierende Verbindungen, s. a. Abbildung 37

Auch ohne den Einfluss der beiden die Chromatogramme dominierenden Verbindungen werden die Gruppen weiterhin getrennt (Abbildung 39). Es bestehen somit auch große Unterschiede zwischen den verschiedenen *Gonystylus spp.* Chargen, wenn nur die verbleibenden Verbindungen betrachtet werden.

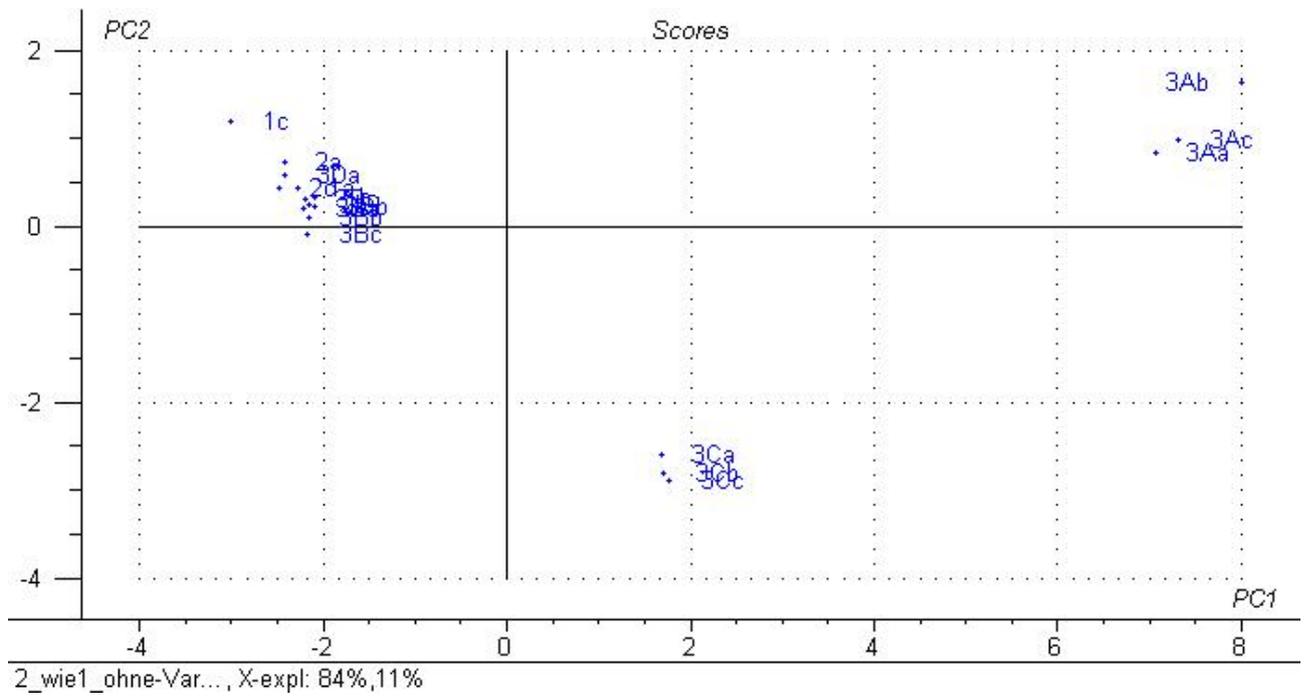


Abbildung 39: PC1 vs PC2 - ohne dominierende Variablen 40/129 und 43/149

Eine PCA ohne die klar abzugrenzenden Proben 3A und 3C führt zu keiner Gruppierung der verbleibenden Proben. Es konnten somit keine systematischen Unterschiede zwischen diesen Proben gefunden werden (Abbildung 40).

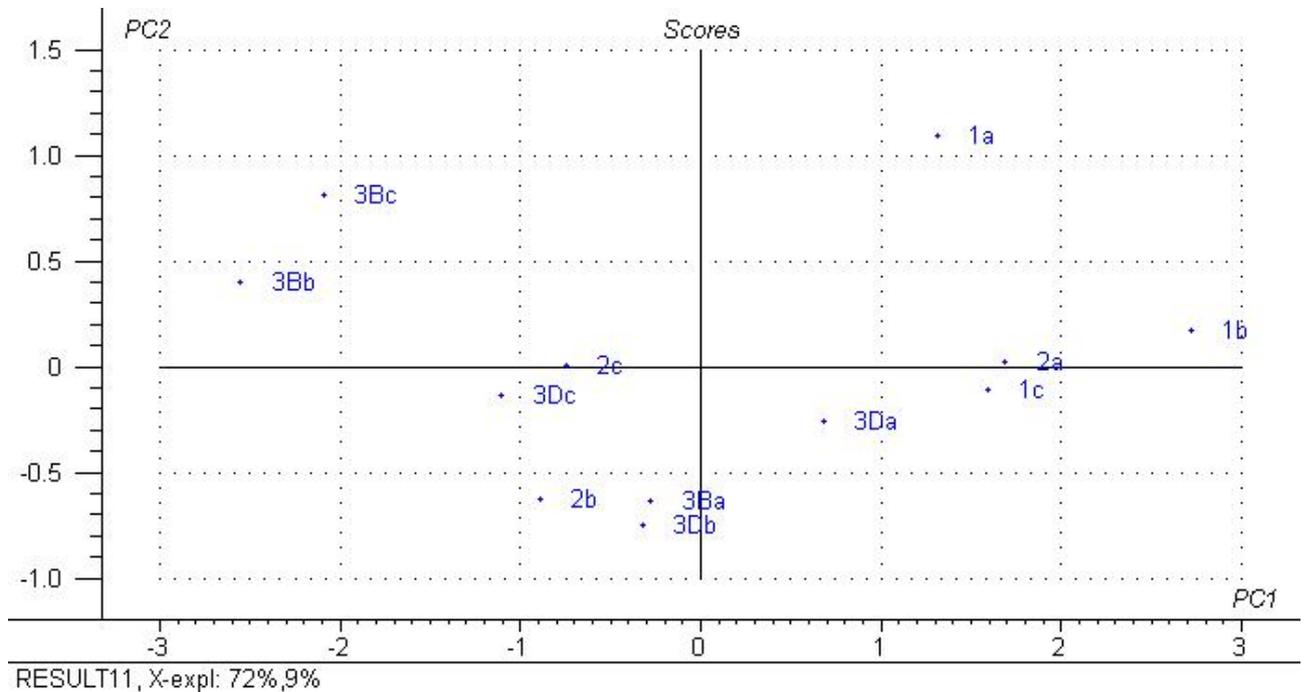


Abbildung 40: PC1 vs PC2 - ohne die Proben 3A und 3C

Da zu den untersuchten Proben keine zusätzlichen Informationen verfügbar sind, gibt es keine Hinweise, ob die Unterschiede evtl. durch das Vorliegen unterschiedlicher Arten oder unterschiedlicher Herkünfte verursacht werden. Interessant ist allerdings, dass die Proben sich so klar gruppieren. Dies spricht für systematische Unterschiede innerhalb der Gattung *Gonystylus spp.*. Um für Identifizierungen geeignete Marker zu finden, die über alle *Gonystylus spp.*-Arten hinweg gültig sind, muss idealerweise ein Datensatz untersucht werden, der die möglichen Variationen abdeckt. Alternativ kann auch mit mehreren Markern gearbeitet werden, die jeweils eine Teilgruppe innerhalb der Gattung *Gonystylus spp.* abdecken. Für die in dem vorliegenden Projekt anvisierte Quantifizierung von *Gonystylus spp.* in Papier ergeben sich aus dieser Erkenntnis Vor- und Nachteile. Markerverbindungen müssen zusätzlich auf die Gültigkeit für die jeweiligen Untergruppen der Gattung *Gonystylus spp.* geprüft werden, eröffnen aber auch die Möglichkeit auf über die Gattung hinausgehende Identifizierungen.

Eine erste Betrachtung der Chromatogramme zeigt eine hohe qualitative Übereinstimmung der Chromatogramme der verschiedenen *Gonystylus spp.*-Proben. Es konnten in einer ersten Durchsicht unter den verwendeten Bedingungen keine Verbindungen gefunden werden, die für die jeweiligen Proben spezifisch wären. Die Unterschiede zwischen den Proben werden durch die relativen Unterschiede der Signalintensitäten, also der mengenmäßigen Zusammensetzung der Extrakte, verursacht, die durch die multivariate Auswertung mittels PCA veranschaulicht werden können. Allerdings können in dem Chromatogramm in Abbildung 38, trotz der optimierten Trennbedingungen, die sogenannten „Alkanberge“ oder „UCM-unresolved complex mixtures“ erkannt werden. Wie vielfältig die Zusammensetzung dieser UCMs sein kann, wurde von (Kuhnert 2011) beschrieben, der den Thearubigenhügel bei Schwarzem Tee untersuchte, dem er in einer ersten Schätzung mit bis zu 30000 Einzelverbindungen eine ähnliche Komplexität wie der Zusammensetzung von Erdöl unterstellte.

4.7.2. Anatomie

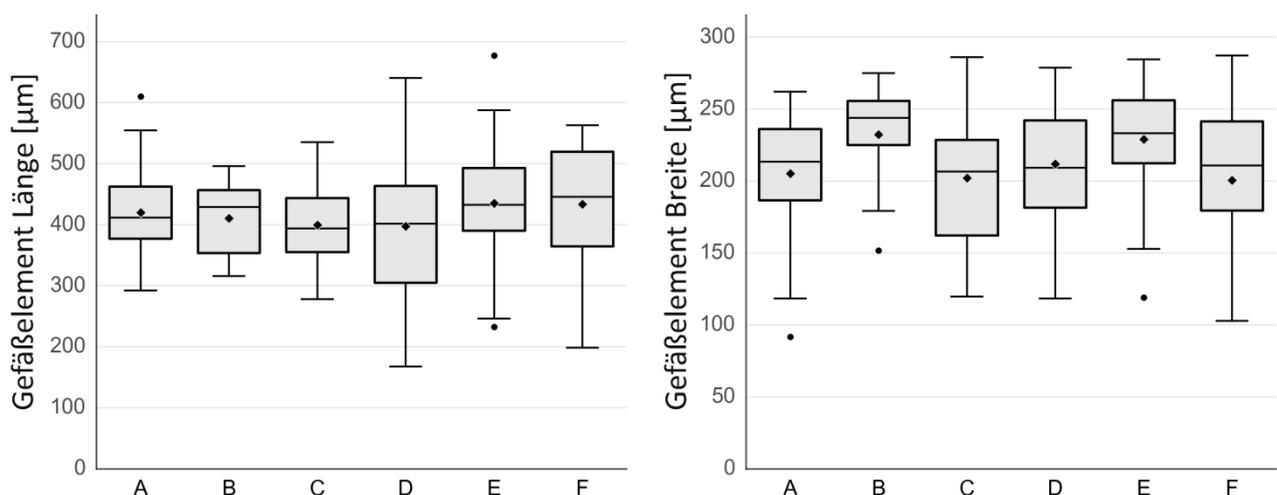
Fünf verschiedene Hölzer der nach CITES geschützten Gattung *Gonystylus* (849-2, 839-3-A, B, C und D) wurden als Mazerat mit den im „Atlas of vessel elements“ veröffentlichten Referenzen lichtmikroskopisch verglichen. Alle zeigen eine exakte Übereinstimmung der Strukturmerkmale der Gefäßelemente (einfache Gefäßenddurchbrechung, wechselständige Gefäßtüpfel, Kreuzungsfeldtüpfel, die in Größe und Form mit den Gefäßtüpfeln übereinstimmen, Anordnung der Tüpfel zu axialen und radialen Parenchymzellen).

Für die Hölzer der umfangreichen Gattung *Shorea* (über 100 Arten) konnten Mazerate aus Holz der Untergattung *Rubroshorea* aus sieben verschiedenen Herkünften mit den Referenzen verglichen werden. Auch hier stimmen die Strukturmerkmale der Gefäßelemente der Proben vollkommen überein (einfache Gefäßenddurchbrechung, wechselständige Gefäßtüpfel, scheinbar einfache Kreuzungsfeldtüpfel, die in ihrer Größe und Form sehr variabel sind, Tüpfel zu paratrachealen Tracheiden).

Analysiert man die Messdaten der Gefäßelemente der verschiedenen Mazerate der beiden Gattungen zusammen mit den Referenzen (**Abbildung 41**), so ist auffällig, dass vor allem der Parameter Gefäßelementbreite bei den Proben von *Shorea* subg. *Rubroshorea* höhere Werte aufweist im Vergleich zu der Referenz. Da die Gefäßelemente der Gattung *Shorea* sehr breit sind und ihre Kreuzungsfelder mit ihren großen, scheinbar einfachen Kreuzungsfeldtöpfeln eher einem Netz als einer Wand gleichen, sind sie besonders instabil. Es ist möglich, dass leichte Unterschiede bei der Präparation (die Referenz- und Varianzproben wurden von unterschiedlichen Personen präpariert) dazu führten, dass die Röhren der Gefäßelemente bei den Varianzproben abgeflachter auf dem Objektträger lagen als bei der Referenzprobe und damit im Durchlichtmikroskop breiter erschienen.

Insgesamt zeigen die Messwerte eine z.T. erhebliche Varianz. Da jedoch allein die Varianz innerhalb einer Probe groß ist und zudem bekannt ist, dass der Durchmesser der Gefäßelemente durch Umweltfaktoren beeinflusst wird, verwendet man bei der Holzartenerkennung am Holz schon aus der jahrzehntelangen Erfahrung die metrischen Daten immer nur in Form von Größenklassen. Für viele Gattungen ist beschrieben, dass deren Gefäßgrößen von Art zu Art tendenziell unterschiedlich sind. Bei der Identifizierung von unbekanntem Faserstoffen kommt erschwerend hinzu, dass es sich meist um Mischpräparate unterschiedlichster Hölzer handelt. Eine statistische Auswertung schließt sich deshalb aus. Stattdessen werden die Messwerte bei der Identifizierung von unbekanntem Proben zusätzlich eingesetzt, um abzugleichen, ob ein Gefäßelement, das von den Strukturmerkmalen einer bestimmten Gattung entspricht, auch von den Messwerten nicht von der Größenklasse der Referenzen abweicht.

Vor diesem Hintergrund zeigen die leichten Abweichungen der Messwerte der untersuchten Zellstoffe der beiden Gattungen zwar einerseits die Varianz der Ausmaße der Gefäßelemente einer Gattung und bestätigen andererseits, dass auch schon die Messwerte der einzelnen Proben die Gattungen für die Anwendung in groben Größenklassen ausreichend widerspiegeln.



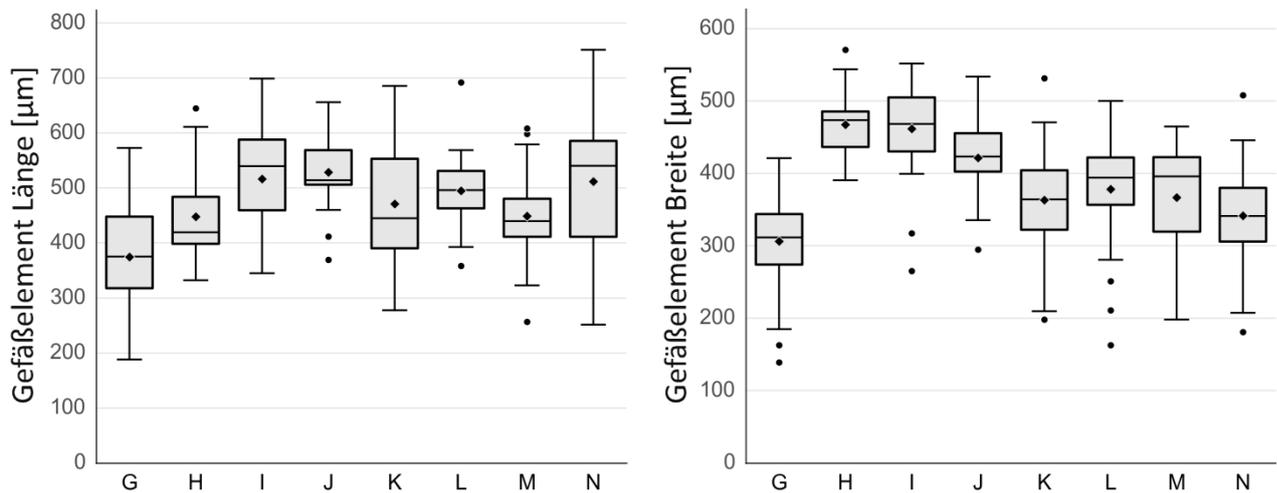


Abbildung 41: Länge und Breite der Gefäßelemente der Varianzproben

(A) – (F): Gattung *Gonystylus*:

(A) Referenz; (B) 849-2; (C) 849-3-A; (D) 849-3-B; (E) 849-3-C (F) 849-3-D

(G) – (N): Untergattung *Shorea subg. Rubroshorea*

(G) Referenz; (H) Central Kalimantan; (I) East Kalimantan; (J) West Kalimantan; (K) Mentawi Islands (L) Molukken;

(M) Sabah; (N) West Malaysia

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die an den Gefäßelementen sichtbaren und im Atlas beschriebenen Strukturmerkmale als konsistent innerhalb der Gattung angenommen und bestätigt werden können. Dies ist in Übereinstimmung mit den Erfahrungen aus der Holzartenidentifizierung von Massivholz anhand der standardisierten Strukturmerkmale im IAWA Bestimmungsschlüssel. Der „Atlas of vessel elements“ kann damit als Referenz für die dargestellten Gattungen angesehen werden.

4.8. Anwendung auf Praxisbeispiele (AP 8)

Wie im Vorläuferprojekt wurde auch in diesem Projekt ein Blindtest durchgeführt. Hierzu wurden die auch für die Erstellung der Datenbank verwendeten sortenreinen Zellstoffe (s. Tabelle 10 im Anhang) der Hochschule München, Fr. Prof. Dr. Helga Zollner-Croll, von der Fakultät Papier und Verpackung, zur Verfügung gestellt. Aus diesen Zellstoffen wurden von der Hochschule München Prüfblätter definierter Zusammensetzung hergestellt, ohne den beteiligten Arbeitsgruppen die Zusammensetzung mitzuteilen. Die Zusammensetzung der Prüfblätter sollte von den beteiligten Arbeitsgruppen erkannt werden.

Die Hochschule München wurde gebeten, die in der Tabelle 11 im Anhang aufgeführten Eckpunkte einzuhalten. Den beteiligten Instituten, Technische Hochschule Darmstadt und der ISEGA wurden die Eckpunkte ebenfalls mitgeteilt. Zudem erhielten die beiden beteiligten Institute mit der Übersendung der Prüfblätter eine vollständige Arbeitsfassung des in diesem und dem Vorläuferprojekt erstellten

Gefäßatlases (Helmling et al. 2017), mit dessen Hilfe die Identifizierungen der Blindproben durchgeführt werden können.

Da mit der Chemotaxonomie eine von der Mikroskopie vollständig unabhängige Methode eingesetzt wurde, entschieden sich die Verfasser für eine entsprechend getrennte Darstellung dieses Untersuchungsabschnittes.

4.8.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der Blindproben

Die Projektteilnehmer haben aus den erhaltenen 15 Prüfblättern angefärbte, mikroskopische Präparate erstellt und im Lichtmikroskop untersucht. Für alle Prüfblätter mussten die Projektteilnehmer festlegen, welche der 32 Zellstoffe (31 aus asiatischen Hölzern plus einen Buchenzellstoff) enthalten sind. Zusätzlich sollten die Teilnehmer für sich einschätzen, welche Ergebnisse der Identifizierungen sie eher als unsicher ansehen – die sie also in einem realen Gutachten entsprechend als nicht „sicher identifizierbar“ vermerken würden.

Für die Auswertung der Prüfblätter mussten je Prüfblatt 32 Entscheidungen, ob der Zellstoff enthalten ist oder nicht, getroffen werden. Daraus ergeben sich insgesamt 480 Entscheidungen. **Die Auswertungen des umfangreichen Blindtests haben ergeben, dass von den Teilnehmer PMV, TI und ISEGA 74, 92 und 96 % richtige Entscheidungen erzielt werden konnten.** Im Vergleich zum Blindtest des Vorläuferprojekts (86, 90 und 86 %) konnten zwei von drei Teilnehmern die Quote signifikant verbessern, obwohl im zweiten Blindtest mehr Zellstoffe (32 statt 23) enthalten waren und damit die Verwechslungsgefahr stieg.

Bei der Selbsteinschätzung haben die Teilnehmer von PMV und TI hervorgehoben, dass eine Differenzierung der Untergattungen der Gattung *Shorea* - aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeiten untereinander - als deutlich schwerer angesehen wird und auch eine Verwechslungsgefahr mit den beiden anderen Gattungen (*Dipterocarpus* und *Parashorea*) aus der Familie der DIPTEROCARPACEAE besteht. Diese Selbsteinschätzung trifft zu, da eine Auswertung der Identifizierung der sechs Zellstoffe der DIPTEROCARPACEAE im Vergleich zur gesamten Studie bei allen Teilnehmern zu einer geringeren Trefferquote führte (63, 82 und 93 % richtige Entscheidungen). Die hohe Bestimmungsquote der ISEGA zeigt jedoch, dass die ausgewählten Hölzer aus der Familie der DIPTEROCARPACEAE mit sehr hohem mikroskopischem Aufwand (hier wurden je Blindtestprobe 15 – 20 Präparate analysiert) sehr gut differenziert werden können.

Eine weitere Gruppe von drei nicht eng verwandten Gattungen (*Gonystylus*, *Lophopetalum* und *Durio*) - aber mit sehr ähnlicher Anatomie der Gefäßelemente - wurde vom Thünen-Institut mit hohem Verwechslungsrisiko eingestuft. Da zu dieser Gruppe die unter CITES-Schutz stehende Gattung *Gonystylus* zählt, ist dies von besonderer Relevanz. Umso erfreulicher ist, dass die Quote der korrekten Identifizierungen in den 15 Blindproben mit 67, 100 und 100 % bei zwei Projektpartnern fehlerfrei erfolgte.

Bei der abschließenden Betrachtung muss berücksichtigt werden, dass in realen Proben weitere Holzarten enthalten sein können, für die noch keine Referenzen vorliegen und die auch eine hohe

Ähnlichkeit zu *Gonystylus spp.* aufweisen könnten. Deshalb ist die Entwicklung der von der Anatomie unabhängigen Chemotaxonomie als zusätzliche bzw. ergänzende Methode von großer Bedeutung. Die guten bis sehr guten Ergebnisse des Blindtests zeigen jedoch eindeutig, dass die im Faseratlas beschriebenen und illustrierten anatomischen Strukturmerkmale erfolgreich für die Bestimmung der Hölzer in Papier verwendet werden können und ein „unverzichtbares“ Referenzmaterial für die Praxis darstellen.

4.8.2. Identifizierung mittels Chemotaxonomie

Wie eine Identifizierung mittels Chemotaxonomie aussehen könnte, soll in dem folgenden Abschnitt beispielhaft gezeigt werden. Da der Datenbankansatz noch in einer frühen Entwicklungsphase ist und noch von etlichen Unzulänglichkeiten geprägt ist, wurde vorerst darauf verzichtet, die bestehende Datenbank auf alle Blindproben anzuwenden, Stattdessen werden in dem folgenden Abschnitt die Möglichkeiten des Datenbankansatzes beispielhaft aufgezeigt.

Es können verschiedene Vergleiche mit Hilfe der in Kap. 4.4.1 erstellten Datenbank durchgeführt werden (Abbildung 43). Der für die Fragestellung im vorliegenden Projekt sich anbietende Vergleich ist der in Abbildung 42 dargestellte Ablauf, der dem Vorgehen bei der Berechnung des fSI entspricht. Jede in der Analysenprobe detektierte Verbindung wird gegen die Datenbank geprüft und es wird festgehalten, ob eine Übereinstimmung mit einer in der Datenbank abgelegten Verbindung gegeben ist. Das Ergebnis dieses Vergleichs wird ausgewertet und in Form einer Tabelle dargestellt, die im besten Falle die qualitative und quantitative Zusammensetzung der untersuchten Mischung wiedergibt.

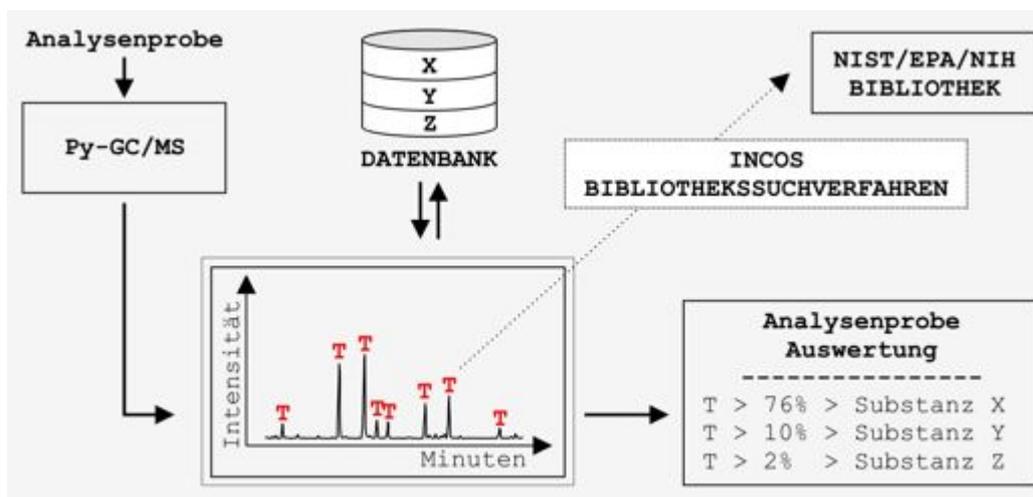


Abbildung 42: Schema der Datenbankabfrage einer zu untersuchenden Probe

Diese theoretische Verfahrensweise stellt sich in der praktischen Anwendung folgendermaßen dar. Die in Form von Prüfblättern vorliegenden Blindproben werden wie in Kap. 4.2 beschrieben aufbereitet und in einer Dreifachbestimmung analysiert. Die Datenvorbehandlung erfolgte wie in Kap. 4.30 beschrieben. Die sich ergebenden GC/MS-Datensätze einer Probe werden übereinandergelegt, um jeweils einen repräsentativen GC/MS-Datensatz für je eine Blindprobe auszuwählen und gegen die in Kap. 4.4.1 erstellte Datenbank zu testen.

Die verschiedenen Möglichkeiten, Vergleiche zwischen der zu untersuchenden Probe und der Datenbank durchzuführen, sind in Abbildung 43 veranschaulicht.

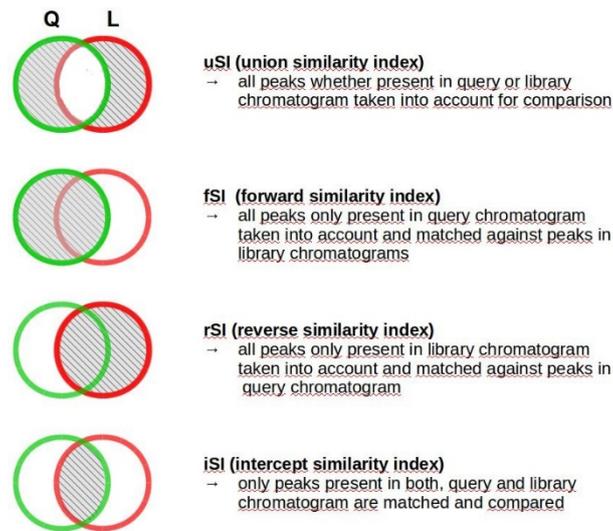


Abbildung 43: Verschiede Vergleiche zwischen Analysenprobe und der in der Datenbank abgelegten Referenzen

Welche Vergleichsergebnisse für die Interpretation verwendet werden, hängt von der jeweiligen Fragestellung ab. Wie die Ergebnisse interpretiert werden können, soll beispielhaft an dem Prüfen der Blindprobe A (OP50135) gegen die Datenbank gezeigt werden.

Bei der im Projekt zu untersuchenden Fragestellung ist eine Möglichkeit der Interpretation das Ordnen der Referenzsubstanzen nach dem rSI (reverse similarity index) wie in Tabelle 9 dargestellt. Danach besitzt *Durio* die höchste Wahrscheinlichkeit, in der Datenbankprobe enthalten zu sein. 11 der 25 für *Durio* in der Datenbank abgelegten Einzelverbindungen werden auch in der Analysenprobe gefunden. Hohe Ähnlichkeitsindizes ergeben sich aber auch für die Gattungen *Calophyllum* bis *Nyssa*. Ein Bruch in den rSI-Werten ist ab *Eucalyptus* zu verzeichnen. Auch weiter unten gelistete Referenzproben dürfen noch nicht als mögliche Mischungskomponenten aussortiert werden. Dies zeigt der Vergleich mit *Mangifera*, der eine Übereinstimmung von 10 konkreten Einzelverbindungen ergibt, die sowohl im *Mangifera*-Extrakt als auch im Extrakt der Blindprobe A gefunden werden. Allerdings wurden auch 91 Einzelverbindungen aus dem Chromatogramm des *Mangifera*-Extraktes in der Datenbank abgelegt, sodass sich ein nur relativ geringer Anteil ergibt, der der Blindprobe zugeordnet werden kann.

Unklar ist bei dieser Darstellung, ob es sich immer um die gleichen 10-13 Einzelverbindungen handelt, die in fast jeder Probe enthalten sind und daher von geringem diagnostischem Wert sind. Außerdem ist der Tabelle zu entnehmen, dass jeweils 36-47 Einzelverbindungen der Blindprobe nicht mit abgelegten Verbindungen der Datenbank übereinstimmen. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei Blindprobe A nicht um einen sortenreinen Zellstoff handelt. Dass nicht alle Einzelverbindungen eines Referenzextraktes in der Analysenprobe gefunden werden, wenn die Analysenprobe aus einer Zellstoffmischung besteht, erklärt sich durch ein Abrutschen der Peakintensitäten unter die jeweilige Detektionsgrenze. Das Ausmaß ist wiederum vom Anteil des jeweiligen Zellstoffs in der Analysenprobe abhängig. Derzeit ist der Zusammenhang zwischen dem Massenanteil, der noch erkannt werden kann,

der Detektionsgrenze der Markerverbindungen und der Qualität der Messbedingungen unklar. Gleiches gilt für die Ähnlichkeitsindizes. Z. B. kann derzeit nicht beurteilt werden, ob ein rSI von 97% hoch ist. Unklar ist auch, weshalb der Wert für z. B. *Durio* anscheinend hoch ist, wenn doch aber nur 44% der duriospezifischen, in der Datenbank abgelegten Einzelverbindungen Ähnlichkeiten mit Einzelverbindungen der Analysenprobe aufweisen.

In der „Chromident Identification Match Table“ (Abbildung 46) können die übereinstimmenden Einzelverbindungen aus der Analysenprobe und dem Referenzextrakt überprüft werden. Die infrage kommenden, übereinstimmenden Einzelverbindungen sind mit einem grünen Punkt gekennzeichnet. Eine sicherere Beurteilung ist nun durch den direkten Vergleich der Originaldaten möglich. Wenn diese übereinstimmenden Verbindungen in den Rohdaten geprüft werden, stellt sich im konkreten Fall heraus, dass die Übereinstimmung vorhanden ist, die Einzelverbindungen aber nur einen geringen diagnostischen Wert besitzen, da sie nahezu ubiquitär sind. Dies trifft z.B. auf die ersten beiden in Abbildung 46 markierten Einzelverbindungen bei 45,289 min (RI=17682) und 57,58 min zu. Der Rohdatenvergleich in Abbildung 44 zeigt die gute Übereinstimmung der Massenspektren. Ein Blick in die „Chromident library peaks“ Tabelle enthüllt, dass die Verbindung außer in *Durio* noch in 19 anderen Referenzextrakten vorkommt (Abbildung 45), also nur von geringem Wert für Identifizierungszwecke ist. Für die zweite in Abbildung 46 markierte Verbindung bei 57,58 min im Blindprobenchromatogramm wurde ebenfalls eine hohe Übereinstimmung, aber ebenfalls nur ein geringer diagnostischer Wert festgestellt, da die Verbindung noch in 18 weiteren Referenzsubtrakten zu finden ist. So wird die hohe Platzierung von *Durio* nachvollziehbar und gleichzeitig muss ein positiver Befund stark bezweifelt werden. Deshalb ist eine alleinige Identifizierung über die rSI-Kennwerte nicht zielführend.

Beim Arbeiten mit der erstellten Datenbank fiel auf, dass mehr als 250 eindeutige, nur für einen Referenzextrakt typische Verbindungen ausgewiesen wurden. Diese Anzahl ist zu hoch. Dafür sind die Extrakte der verschiedenen Zellstoffe zu ähnlich und die Anzahl der in den einzelnen Extraktchromatogrammen detektierten Einzelverbindungen (wegen der suboptimalen Signalqualität) zu niedrig. Diese zu hohe Anzahl würde die Gefahr von falsch positiven Identifizierungen erhöhen. Auch dieses Verhalten der Datenbanksoftware muss mit den Entwicklern der Software noch einmal diskutiert werden.

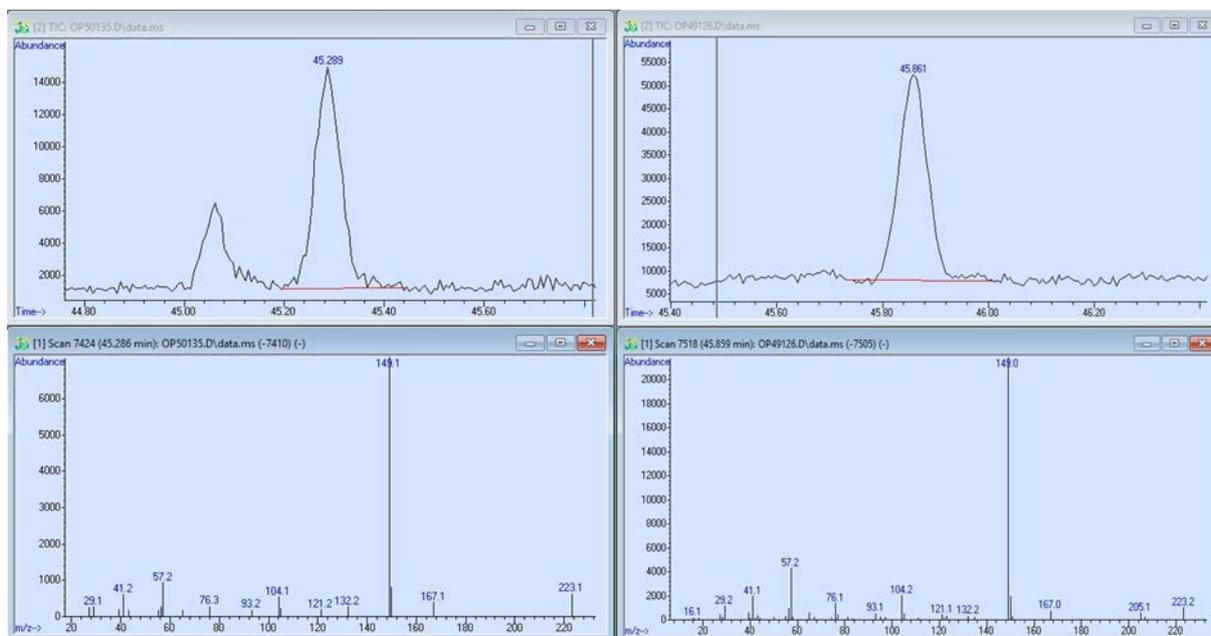


Abbildung 44: Rohdatenvergleich Blindprobe A mit *Durio* – Einzelverbindung bei ca. 45,3 min

ChromIdent Databases ChromIdent Library Peaks Chromatogram File Explorer (MSD)

Active	Sample	Peak Area	Effective P...	RI	RT(min) ▲	Sample Count	Origins	...	ID
<input checked="" type="checkbox"/>	[Dipterocarpus]	6,000,486	6,000,486	17,799	45.773	1	[OP48747]		476
<input checked="" type="checkbox"/>	[Schima, Calophyllum, Mangifera, Dendrocalamus, Cana...]	55,594,912	55,594,912	17,680	45.81	20	[OP49126, ...]		280

Abbildung 45: In Datenbank abgelegte Einzelverbindung mit RI=17680

Eine weitere Interpretationshilfe wird durch die „peak list“ gegeben, in der alle in der Analysenprobe detektierten Einzelverbindungen gelistet sind und jeweils einem Referenzextrakt zugeordnet werden, s. grüne Markierung in Abbildung 47. Derzeit ist jedoch nicht ersichtlich, wie diese Zuordnung genau vorgenommen wird. Wünschenswert wäre, statt dieser Zuordnung oder zusätzlich, eine Auswertung mit Berücksichtigung der Güte der Datenbanktreffer zu erhalten, also eine Bewertung der Treffer je nachdem, in wie vielen Referenzsubstanzen sie vorkommen. Die Information liegt nach dem Sortieren der Treffer bei der Datenbankerstellung schon vor, s. Abbildung 16 bis Abbildung 18.

Unklar ist derzeit auch, weshalb für die „Chromident Identification Match table“ die RT- und nicht die RI-Werte verwendet werden.

Tabelle 9: Ergebnistabelle nach Abgleich der Probe 1 (OP50135) mit der MTH-Datenbank - Referenzproben geordnet nach rSI

ChromIdent Identification Table ChromIdent Identification Details Table

Sample	Origin	# Union	# Forward	# Reverse	# Intersection	Unidentified Peak Count	uSI	fSI	rSI	iSI
[Durio]	OP49126	63.0	49.0	25.0	11.0		38.0	31,57%	32,20%	96,96%	99,59%
[Calophyllum]	OP49133	68.0	49.0	31.0	12.0		37.0	31,28%	32,14%	96,39%	99,43%
[Lophopetal...	OP49214	65.0	49.0	27.0	11.0		38.0	31,38%	32,30%	96,18%	99,68%
[Rhizophora]	OP49198	69.0	49.0	30.0	10.0		39.0	31,26%	32,18%	96,04%	99,31%
[Hevea]	OP49275	65.0	49.0	29.0	13.0		36.0	31,51%	32,40%	95,36%	99,17%
[Cocos]	OP49226	73.0	49.0	35.0	11.0		38.0	30,86%	32,26%	95,00%	99,55%
[Schima]	OP49278	69.0	49.0	31.0	11.0		38.0	30,95%	32,18%	94,69%	99,31%
[Dendrocala...	OP49238	69.0	49.0	31.0	11.0		38.0	30,80%	32,26%	94,13%	99,56%
[Nyssa]	OP49286	85.0	49.0	48.0	12.0		37.0	29,95%	32,19%	92,03%	99,31%
[Eucalyptus]	OP49113	69.0	49.0	30.0	10.0		39.0	25,47%	32,21%	78,78%	82,80%
[Heritiera]	OP48991	67.0	49.0	29.0	11.0		38.0	31,93%	32,30%	76,00%	76,00%
[Canarium]	OP49267	85.0	49.0	48.0	12.0		37.0	22,65%	31,82%	69,75%	99,10%
[Ilex]	OP49295	113.0	49.0	74.0	10.0		39.0	21,88%	31,98%	67,19%	99,39%
[Tetramerist...	OP48998	76.0	49.0	38.0	11.0		38.0	30,97%	32,27%	64,04%	64,04%
[Paulownia]	OP48987	79.0	49.0	40.0	10.0		39.0	30,42%	32,29%	40,69%	40,69%
[Alniphyllum]	OP49002	88.0	49.0	49.0	10.0		39.0	13,04%	31,63%	37,81%	37,81%
[Intia]	OP49234	89.0	49.0	49.0	9.0		40.0	8,37%	32,16%	25,90%	99,49%
[Mangifera]	OP48736	130.0	49.0	91.0	10.0		39.0	3,53%	5,27%	23,64%	23,64%
[Subg-Rich...	OP49230	81.0	49.0	38.0	6.0		43.0	6,65%	31,82%	20,58%	99,29%
[Tetramerista]	OP48785	128.0	49.0	88.0	9.0		40.0	3,35%	5,51%	17,99%	17,99%
[Castanopsis]	OP49299	86.0	49.0	43.0	6.0		43.0	5,59%	31,87%	17,51%	99,27%
[Koompassia]	OP48781	124.0	49.0	83.0	8.0		41.0	1,37%	4,16%	16,38%	16,38%
[Avicennia]	OP48752	128.0	49.0	85.0	6.0		43.0	1,15%	3,36%	15,82%	15,82%
[Dipterocar...	OP48747	102.0	49.0	56.0	3.0		46.0	2,35%	15,56%	15,08%	84,47%

ChromIdent Identification Match Table ⌵ ChromIdent Identification Match Details Table

Table Content Reverse

Sample	Origin	Query ...▲	Library RT	Query Area	Library Area	Area Delta
Durio	OP49126	0	40.08	0	1,333,134	0,00%
Durio	OP49126	39.52	46.924	314,951	1,109,031	71,60%
Durio	OP49126	45.286	45.859	426,611	1,602,253	73,37%
Durio	OP49126	48.404	50.109	5,712,338	1,231,003	-364,04%
Durio	OP49126	54.42	43.575	1,453,507	1,083,337	-34,17%
Durio	OP49126	55.479	58.907	895,872	6,036,709	85,16%
Durio	OP49126	57.58	58.219	780,000	2,934,495	73,42%
Durio	OP49126	58.274	64.564	1,538,729	13,104,662	88,26%
Durio	OP49126	58.773	53.165	973,044	3,658,335	73,40%
Durio	OP49126	61.002	61.696	43,839,273	171,954,337	74,51%
Durio	OP49126	63.48	13.386	713,532	2,943,496	75,76%
Durio	OP49126	63.797	56.088	4,178,801	3,655,727	-14,31%
Durio	OP49126	65.24	66.043	3,448,639	2,121,396	-62,56%
Durio	OP49126	66.993	67.888	3,918,209	14,001,146	72,02%
Durio	OP49126	70.586	71.615	3,703,104	11,966,722	69,05%
Durio	OP49126	73.411	48.891	5,415,954	4,384,445	-23,53%
Durio	OP49126	74.544	75.731	2,897,609	9,518,321	69,56%
Durio	OP49126	78.538	81.326	17,885	11,972,740	99,85%
Durio	OP49126	78.891	80.23	1,664,380	1,934,341	13,96%
Durio	OP49126	80.249	81.68	23,892,443	28,805,112	17,05%
Durio	OP49126	83.5	77.131	834,154	1,569,932	46,87%
Durio	OP49126	84.481	78.501	1,314,077	6,233,165	78,92%
Durio	OP49126	84.87	83.799	1,639,854	4,258,191	61,49%
Durio	OP49126	87.403	79.896	996,160	11,471,664	91,32%
Durio	OP49126	87.787	54.706	2,358,065	1,146,814	-105,62%

Abbildung 46: "Match table" des "reverse fit" für den Abgleich der Probe 1 (OP50135) mit dem in der MTH-Datenbank abgelegten *Durio*-Extrakt

Peak List (MSD) ⌵

A...	RT (min)	RI	Area	Start RT	Stop RT	Width	Scan# at Peak Maximum	S/N	Leading	Tailing	Name
<input checked="" type="checkbox"/>	39.520	16000	314951	39.368	39.593	0.039	6477	4.454	1.329	0.752	Tetramerista-2
<input checked="" type="checkbox"/>	45.286	17682	426610	45.128	45.572	0.042	7424	6.571	0.803	1.246	Cocos
<input checked="" type="checkbox"/>	48.404	18648	5712337	48.136	48.903	0.066	7936	46.540	2.907	0.344	Mangifera
<input checked="" type="checkbox"/>	49.202	18898	615612	49.031	49.348	0.043	8067	8.164	0.824	1.214	Mangifera
<input checked="" type="checkbox"/>	52.563	19995	155459	52.392	52.587	0.025	8619	4.286	1.167	0.857	Tetramerista-2
<input checked="" type="checkbox"/>	52.751	20059	807682	52.593	53.452	0.039	8650	12.726	0.831	1.204	Canarium
<input checked="" type="checkbox"/>	53.817	20425	1709800	53.616	53.981	0.049	8825	14.564	1.025	0.976	Mangifera
<input checked="" type="checkbox"/>	54.420	20633	1453507	54.231	54.657	0.046	8924	17.051	0.801	1.249	Hevea
<input checked="" type="checkbox"/>	55.479	20996	895872	55.309	56.003	0.044	9098	11.533	0.970	1.031	Mangifera
<input checked="" type="checkbox"/>	57.580	21746	780000	57.403	57.817	0.050	9443	10.301	1.185	0.844	Nyssa
<input checked="" type="checkbox"/>	58.012	21900	1055338	57.842	58.097	0.046	9514	13.662	0.874	1.145	Mangifera
<input checked="" type="checkbox"/>	58.274	21993	1538729	58.110	58.475	0.047	9557	20.810	1.245	0.803	Subg-Shorea
<input checked="" type="checkbox"/>	58.773	22179	973044	58.609	59.370	0.041	9639	12.170	0.680	1.470	Nyssa
<input checked="" type="checkbox"/>	61.002	23008	43839273	60.740	61.599	0.057	10005	485.304	2.493	0.401	Schima

Abbildung 47: Ausschnitt aus der "peak list" nach Abgleich der Probe 1 (OP50135) mit der MTH-Datenbank

Die manuelle Prüfung der Ergebnisse der Datenbankabfrage ergibt ein auffälliges Peakmuster durch die Verbindungen 1 bis 5 in der Blindprobe A zwischen RT=100 bis 112 min (**Abbildung 48**). Über die RT-, bzw. RI-Werte kann in der „Chromident library peaks“-Tabelle (Abbildung 16 bis Abbildung 18) ermittelt werden, in welchen Referenzextrakten diese Verbindungen vorkommen. Im konkreten Fall findet sich dieses Muster mit hoher Übereinstimmung in *Dipterocarpus*-Extrakten. Die Verbindungen 1,2 und 4 sind in der MTH-Datenbank als spezifisch für *Dipterocarpus* erfasst. Verbindung 3 ist als typisch für *Dipterocarpus*, *Shorea subg. Rubroshorea* und *Tetramerista* abgelegt und Verbindung 5 kommt in *Dipterocarpus* und vier weiteren Referenzextrakten vor. Dieses aus 5 Peaks bestehende Muster findet sich auch in der Blindprobe G, die ebenfalls Dipterocarpus-Extrakt enthält. Dieses Peakmuster darf somit vorläufig als Erkennungsmerkmal für *Dipterocarpus* gelten, auch bei Gehalten von lediglich 10% und ist ein Beispiel, wie mit Hilfe des Datenbankansatzes Identifizierungsmerkmale erkannt werden können.

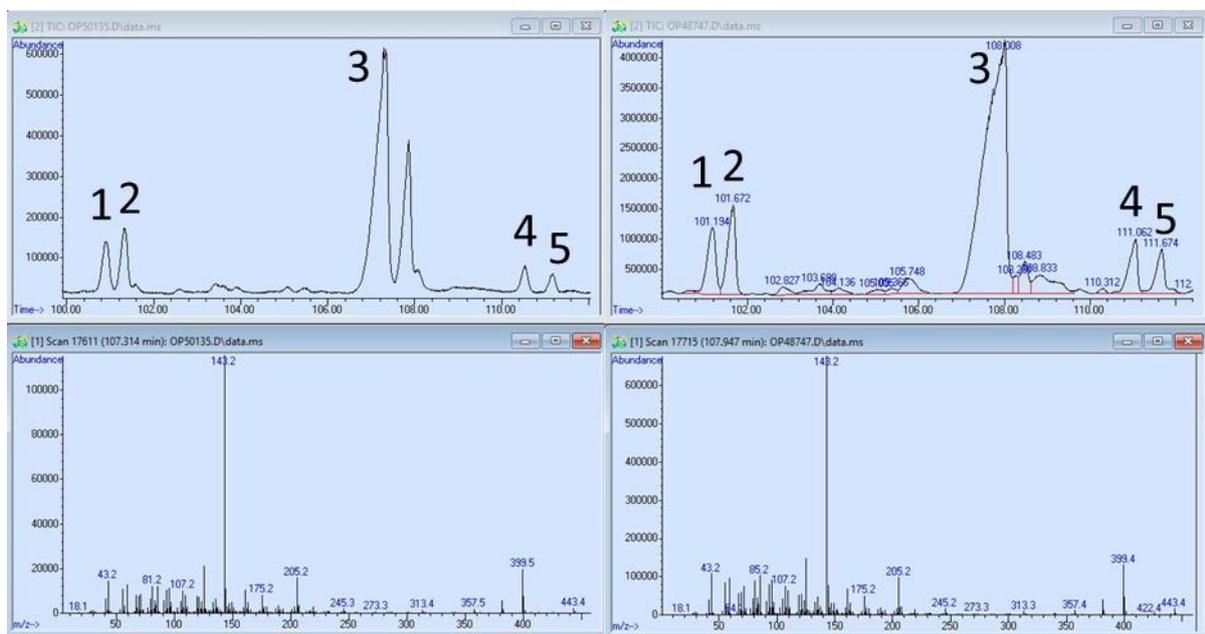


Abbildung 48: Dipterocarpus Peakmuster

4.8.2.1. Fazit – Identifizierung mittels Chemotaxonomie:

Es ist schon in diesen ersten Anwendungen zu erkennen, dass der Datenbankansatz eine sehr wertvolle Hilfe ist, die bei der Chemotaxonomie anfallenden Datenmengen zu bewältigen und die sich daraus ergebenden Interpretationsmöglichkeiten zu nutzen, um Identifizierungen vornehmen zu können. Dass die systematischen Unterschiede zwischen den Extraktstoffzusammensetzungen der untersuchten Gattungen vorhanden sind, zeigt sich in verschiedenen Konstellationen dieses Untersuchungsabschnitts, aber auch in den vorhergehenden Abschnitten. Die Unterschiede können jedoch noch nicht gut genug erfasst werden und deshalb für die Identifizierungszwecke noch nicht genutzt werden. Bevor der chemotaxonomische Ansatz ernsthaft eingesetzt werden kann, müssen die noch bestehenden, weiter oben erwähnten Unklarheiten bei der Berechnung der verschiedenen Kennwerte geklärt und weitere spezifische Auswertungen umgesetzt werden. Da die für den Datenbankansatz genutzte Software *Openchrom* neu, bzw. noch unter intensiver Entwicklung steht,

fehlen Erfahrungen im Einsatz der Software im Hinblick auf Aussagekraft der Kennwerte und Stärke der Ergebnisbeeinflussung durch die Parameterwahl sowohl bei der Datenbankerstellung als auch bei der Datenbankabfrage. Diese Erfahrungen ergeben sich durch den Abgleich der Ergebnisse der Datenbankabfragen mit der bekannten Zusammensetzung der untersuchten Analysenproben.

Zusätzliches Verbesserungspotential ergibt sich:

- Durch die Nutzung von Informationen aus einer PCA mit den gleichen Referenzproben zur Auffindung weiterer Markerverbindungen.
- Durch die Messung der Analysenproben im SIM-Modus, um die Empfindlichkeit zu verbessern und Überlagerungen zurückzudrängen. Vorstellbar wäre, aus den Massenspektren der eindeutigen Einzelverbindungen in der Datenbank repräsentative Massenspuren auszuwählen, und mit diesen Massenspuren eine SIM-Methode zu erstellen, die dann zur Messung der Analysenproben verwendet wird. Diese Vorteile wurden bei den Versuchen zur Identifizierung von *Gonystylus spp.* schon genutzt, s. Kap. 33, und könnten auch im Zusammenhang mit dem Datenbankansatz eingesetzt werden.

5. Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge

5.1. Öffentlichkeitsarbeit

Das Projekt wurde bei der „Nacht des Wissens“ 2013, 2015 und 2017 in Hamburg sowie auf der Grünen Woche 2017 in Berlin und der Ligna 2015 und 2017 in Hannover vorgestellt.

Während des Branchentags des GD Holz in Köln wurde das Projekt am Stand des Thünen-Instituts/Universität Hamburg thematisiert.

5.2. Veröffentlichungen

Helmling S, Olbrich A, Heinz I, Koch G (2018) Atlas of vessel elements – identification of Asian timbers. IAWA Journal 39 (3)

Koch G, Haag V, Helmling S, Heinz I, Olbrich A (2017) Fasern im Fokus: Holzartenbestimmung von Faserplatten - Erfahrungen aus den Prüfungen im Kontext der EUTR. MDF Mag Co: 86-88

Helmling S, Olbrich A, Tepe L, Koch G (2016) Qualitative and quantitative characteristics of macerated vessels of 23 mixed tropical hardwood (MTH) species: a data collection for the identification of wood species in pulp and paper. Holzforschung 70: 839-844

Koch, G., Haag, V, Heinz, I., Richter, H.G. (2016): Die Europäische Holzhandelsverordnung (EUTR). Anforderungen an die Holzartenbestimmung in der Praxis. Holztechnologie 57(1), 5-11.

5.3. Vorträge

Olbrich A (2017) Wood identification. BRC Timber Workshop, London, UK

Olbrich A, Heinz I (2017) CITES-geschützte Hölzer in Zellstoff und Papier? Aufbau einer Datenbank (Faseratlas) für die Bestimmungen von tropischen Hölzern in Papier. Informationsveranstaltung über Anforderungen und Auswirkungen der neuen CITES-Listungen wichtiger Wirtschaftsbaumarten für die Holzverwendung und den Holzhandel – BfN und Thünen Institut, Hamburg

Olbrich A, Koch G (2017) Identifizierung von Tropenhölzern in Papier mit holzanatomischen Methoden. Workshop - Illegalen Holzeinschlag eindämmen DBU, Osnabrück

Odermatt J, Wassink A (2017) Identifizierung von Tropenhölzern in Papier mit chemischen Methoden. Workshop - Illegalen Holzeinschlag eindämmen DBU, Osnabrück

Olbrich A (2017) Wood identification. WWF GFTN-UK meeting, London, UK

Olbrich A (2016) Artbestimmung in der Holzanatomie. FSC-Exkursion: Holzherkünfte unter der Lupe, Großhansdorf

Olbrich A (2016) Ist Tropenholz im Papier? Deutsche Aktionstage Nachhaltigkeit, Hamburg

Olbrich A, Helmling S, Tepe L, Poth S, Kuck A, Koch G (2015) Identifizierung des CITES geschützten Ramins in Papier und Faserplatten. Erkennung und Bestimmung von CITES-Hölzern im Handel – BfN und Thünen Institut, Hamburg

Olbrich A, Wassink A (2015) Identifizierung von Tropenhölzern in Papier und Faserplatten. 3. Dresdener Holzanatomisches Kolloquium (ihd), Dresden

Olbrich A, Helmling S, Tepe L, Poth S, Kuck A, Koch G (2014) Identifizierung von „Mixed Tropical Hardwood (MTH)“ in Papier – ein Beitrag zum Artenschutz. Abschluss-Meeting zum DBU Projekt Az. 29436, Osanbrück

Olbrich A (2014) Identification of Mixed Tropical Hardwood in Pulp and Paper. Chatham House - Pulp and Paper Workshop, Teddington, UK

6. Fazit/Ausblick

Im vorliegenden Projekt wurden zwei verschiedene Ansätze zur Identifizierung von MTHs in Papier verfolgt, die Chemotaxonomie und die Anatomie mittels Mikroskopie.

Die Synergien, die sich durch die Anwendung der beiden voneinander unabhängigen Methoden ergeben, können noch nicht genutzt werden, was auf den Nachholbedarf der Chemotaxonomie im Hinblick auf die generelle Methodenentwicklung zurückgeführt werden muss.

Im vorliegenden Projekt wurde im Bereich der Chemotaxonomie eine geeignete Kombination aus: Probenvorbereitung, Extraktion und 1D-GC-Charakterisierung der erhaltenen Extrakte aus gebleichten Zellstoffen/Papier erarbeitet. Es zeigte sich, dass das Auflösungsvermögen der 1D-GC teilweise nicht ausreicht, die Vielzahl an noch auffindbaren, sekundären Pflanzenstoffen vollständig aufzutrennen. Erste Versuche durch verbesserte Fraktionierung mittels SPE oder durch besser auflösende Chromatographie, mittels 2D-GC, versprechen einen noch höheren Informationsgehalt und damit eine bessere Basis zum Auffinden von systematischen Unterschieden zwischen den Gattungen, die dann für Identifizierungen genutzt werden können (s. Kap. 4.2.2 und 4.2.3.2).

Aber auch die durch 1D-GC gewonnene Informationsmenge ist schon sehr hoch (30 bis 300 Einzelverbindungen/Extrakt). Die Verarbeitung der sich in Form der GC/MS-Datensätze ergebenden Informationsmenge ist nur durch geeignete rechnergestützte Auswertung denkbar. Die Prüfung spezifischer Auswertsoftware für die GC/MS-Datensätze, offenbarte jedoch noch Mängel (s. Kap. 4.3.1). Diese Mängel sind von den Softwareentwicklern registriert und werden in Kürze abgestellt. Erst mit einem geeigneten Datenbankansatz ist eine systematische Auswertung der verfügbaren Informationen zielführend, weshalb auf eine Auswertung der Blindproben mittels Chemotaxonomie (s. Kap. 4.8) zum jetzigen Zeitpunkt verzichtet wurde.

Die verschiedenen PCA-Auswertungen, z. B. in Kap. 4.7.1, in denen die Herkünfte verschiedener *Rubroshorea*-Arten im Ansatz unterschieden werden konnten, lassen die Möglichkeiten von Identifizierungen durch die Chemotaxonomie erahnen. Die Ergebnisse belegen das Potential der

Chemotaxonomie, über die Gattungsebene hinaus Identifizierungen zu erzielen. Die systematischen Unterschiede sind auf die „Fingerprint“-Eigenschaften des chromatographisch ermittelten Extraktstoffprofils zurückzuführen. Dieser Ansatz wird in vielen Bereichen für Identifizierungen oder Qualitätsfragen genutzt. Beispiele dafür sind die Charakterisierung der Qualität chinesischer Heilmittel, die aus Extrakten entsprechender Heilpflanzen stammen (Liang et al. 2010), der Herkunft und Qualität verschiedener Weine (Zea et al. 2007) oder auch der Charakterisierung von Rohöl (Wei et al. 2017). Ob solche „Fingerprints“ auch für Fragen der Rückverfolgbarkeit durch die Charakterisierung/Identifizierung einzelner Papier- oder Zellstofflieferungen im Zusammenhang mit den aus dem EUTR resultierenden Sorgfaltspflichten genutzt werden können (s. Kap. 2), ist eine weitere interessante Fragestellung. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse zur Variabilität innerhalb der Gattung allerdings auch, dass die Extraktstoffzusammensetzung deutlich stärker von diesen Variationen beeinflusst wird als die anatomischen Merkmale (Kap. 4.7.)

Diese Variationen innerhalb der Gattung sind vermutlich ein wichtiger Grund, weshalb die Quantifizierung von *Gonystylus spp.* in Papier nur in Einzelfällen gelingt, aber bisher nicht mit einer für alle Fälle geltenden chemotaxonomischen Methodik. Im Einzelfall konnte eine Quantifizierung auch bei niedrigen, einstelligen Prozentanteilen von *Gonystylus*-Zellstoff in Mischungen mit industriell hergestelltem MTH-Zellstoff erreicht werden (s. Kap. 4.4.2).

Wie sich diese gattungsimmanenten Variationen bei weiteren Untersuchungen auswirken ist eine spannende Fragestellung. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob eine verbesserte Auswertung allein oder auch in Kombination mit einer verbesserten Auflösung zu universellen Gattungsmarkern führen. Hierdurch würde nicht nur die Informationsnutzung verbessert, sondern auch die Informationsmenge gesteigert. Dadurch wären trotz der gattungseigenen Variationen vielleicht sogar art- oder herkunftsspezifische Unterschiede erkennbar, was über die Gattungsebene hinausreichende Identifizierungen ermöglichen würde. Diese Informationen könnten dann wie weiter oben schon beschrieben für die Erfüllung der Sorgfaltspflichten, die sich aus dem EUTR und HolzSIG ergeben, genutzt werden.

Methodisch wird die Reproduzierbarkeit ein wichtiger Aspekt in den weiteren Untersuchungen sein. Bisher lag der Focus noch nicht auf der Reproduzierbarkeit, da zuerst der generelle Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte der Methodik festgelegt werden musste. Verschiedene Aspekte müssen in diesem Zusammenhang untersucht werden. Als Bestandteil einer Validierung muss die Reproduzierbarkeit der Methodik an sich betrachtet und gegebenenfalls verbessert werden (Becerra und Odermatt 2012). Für die anvisierten Anwendungen auf industriell hergestellte Papiere müssen Einflüsse durch die anderen Papierkomponenten, wie Füllstoffe, Additive und Recyclingfasern, berücksichtigt werden.

Im Bereich der Anatomie wurden die anatomisch-strukturellen Referenzen zur Identifizierung von 38 Gattungen/Untergattungen asiatischer Hölzer in Papier grundlegend ausgearbeitet, dokumentiert und werden als „Atlas of vessel elements - Identification of Asian Timbers“ im IAWA Journal in 2018 veröffentlicht.

Der im Projekt durchgeführte Blindtest zeigt eindeutig, dass unbekannte Proben mit den somit für die Öffentlichkeit zugänglichen Referenzen verglichen werden und damit identifiziert werden können. Bei der Identifikation kann man jedoch „nur“ mit der „besten“ Übereinstimmung zu den bestehenden Referenzen argumentieren. Für einen gerichtsfesten Beweis, dass beispielsweise ein Papier unter anderem Holz der unter CITES-Schutz stehenden Gattung *Gonystylus* enthält, ist deshalb unerlässlich, eine von der Anatomie unabhängige Methode zu etablieren.

7. Literaturverzeichnis

Anonymous (2013): The Plant List. Online verfügbar unter <http://www.theplantlist.org/>, zuletzt aktualisiert am 12.02.2014, zuletzt geprüft am 19.02.2018.

Anonymous (2016a): GLOBAL FOREST PRODUCTS FACTS AND FIGURES 2016. Hg. v. FAO. Online verfügbar unter <http://www.fao.org/3/i7034EN/i7034en.pdf>, zuletzt geprüft am 21.02.2018.

Anonymous (2016b): LEITFADEN ZUR EU-HOLZVERORDNUNG. EUROPÄISCHE KOMMISSION. Brüssel.

Barnosky, Anthony D.; Matzke, Nicholas; Tomiya, Susumu; Wogan, Guinevere O. U.; Swartz, Brian; Quental, Tiago B. et al. (2011): Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? In: *Nature* 471 (7336), S. 51–57. DOI: 10.1038/nature09678.

Becerra, Valentina; Odermatt, Juergen (2012): Detection and quantification of traces of bisphenol A and bisphenol S in paper samples using analytical pyrolysis-GC/MS. In: *ANALYST* 137 (9), S. 2250–2259. DOI: 10.1039/c2an15961a.

Boeing, Niels (2017): Artensterben: Die Schmutzigen, Hässlichen und Gemeinen. In: *Zeit online*.

Carpenter, Charles H. (1931): An atlas of paper-making fibres (4).

Del Rio, J.C; Marques, Gisela; Rodríguez, Isabel M.; Gutiérrez, Ana (2009): Chemical composition of lipophilic extractives from jute (*Corchorus capsularis*) fibers used for manufacturing of high-quality paper pulps. In: *INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS* 30 (2), S. 241–249. DOI: 10.1016/j.indcrop.2009.04.001.

Di Lallo, Giulio; Mundhenk, Philip; Zamora López, Sheila; Marchetti, Marco; Köhl, Michael (2017): REDD+. Quick Assessment of Deforestation Risk Based on Available Data. In: *Forests* 8 (12), S. 29. DOI: 10.3390/f8010029.

Dieter, Matthias; Englert, Hermann; Weimar, Holger (2012): Holz aus illegalem Einschlag in Deutschland und der EU: Status-Quo-Bericht zum Inkrafttreten des Holzhandels-Sicherungs-Gesetz (Holz-SiG). In: *Holzzentralblatt*.

Dieter, Matthias; Jochem, Dominik (2017): Holzhandel von und mit China. DBU Workshop "Illegalen Holzeinschlag eindämmen". Hg. v. DBU.

Eiserbeck, Christiane; Nelson, Robert K.; Grice, Kliti; Curiale, Joseph; Reddy, Christopher M. (2012): Comparison of GC–MS, GC–MRM–MS, and GC×GC to characterise higher plant biomarkers in Tertiary

- oils and rock extracts. In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 87, S. 299–322. DOI: 10.1016/j.gca.2012.03.033.
- Flosdorff, N.; Hirschberger, P.; Jokiel, D.; Plaep C.; Zahnen, J. (2010): Tropenwaldzerstörung für Kinderbücher. Hg. v. Berlin WWF Deutschland.
- Gardner, Toby A.; Barlow, Jos; Chazdon, Robin; Ewers, Robert M.; Harvey, Celia A.; Peres, Carlos A.; Sodhi, Navjot S. (2009): Prospects for tropical forest biodiversity in a human-modified world. In: *Ecology Letters* 12 (6), S. 561–582. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2009.01294.x.
- Helena Burkhardt (2016): Quantifizierung von Raminzellstoff in Mixed-Tropical-Hardwoodzellstoff. Bachelorarbeit. Uni Hamburg, Hamburg.
- Helmling, Stefanie; Olbrich, Andrea; Heinz, Immo; Koch, Gerald (2017): Atlas of vessel elements. Identification of Asian Timbers. In: *IAWA JOURNAL*.
- Hirschberger, P.; Beuter, C.; Gotthardt, S.; Zahnen, J. (2012): Im Wald, da sind die Räuber. Hg. v. Thomas Köberich: WWF Deutschland.
- Kleemann, Stephan (2006): Chemische Additive (CHAD): „Chemische Additive – funktionell unentbehrlich und ökologisch nützlich“ (Teil III). Vortragsreihe des ZELLCHEMING-Fachausschusses. In: *Wochenblatt fuer Papierfabrikation* (22), S. 1297.
- Koch, Gerald; Haag, Volker (2017): Auswirkungen der neuen CITES-Listungen wichtiger Wirtschaftsbaumarten für die Holzverwendung und den Holzhandel. In: *Holzzentralblatt*.
- Kuhnert, Nikolai (2011): Was unter dem Hügel steckt. In: *Nachr. Chem.* 59 (9), S. 866–871. DOI: 10.1002/nadc.201190027.
- Lawson, Sam (2014): Consumer Goods and Deforestation: An Analysis of the Extent and Nature of Illegality in Forest Conversion for Agriculture and Timber Plantations. Hg. v. Forest Trends: The Family of Forest Trends Initiatives on ecosystem service payments and markets Forest Trends Initiatives (Forest Trends Report Series Forest Trade and Finance).
- Liang, Yizeng; Xie, Peishan; Chau, Footim (2010): Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines. In: *Journal of separation science* 33 (3), S. 410–421. DOI: 10.1002/jssc.200900653.
- McClure, Pamela J.; Chavarria, Gabriela D.; Espinoza, Edgard (2015): Metabolic chemotypes of CITES protected Dalbergia timbers from Africa, Madagascar, and Asia. In: *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 29 (9), S. 783–788. DOI: 10.1002/rcm.7163.
- Mondello, Luigi; Casilli, Alessandro; Tranchida, Peter Quinto; Dugo, Giovanni; Dugo, Paola (2005): Comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with rapid scanning quadrupole mass spectrometry in perfume analysis. In: *Journal of Chromatography A* 1067 (1-2), S. 235–243. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.09.040.
- Mouillot, David; Bellwood, David R.; Baraloto, Christopher; Chave, Jerome; Galzin, Rene; Harmelin-Vivien, Mireille et al. (2013): Rare species support vulnerable functions in high-diversity ecosystems. In: *PLoS biology* 11 (5), e1001569. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001569.

- Naik, S. N.; Lentz, H.; Maheshwari, R. C. (1989): Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid–vapor equilibrium conditions. In: *Fluid Phase Equilibria* 49, S. 115–126. DOI: 10.1016/0378-3812(89)80009-3.
- Odermatt, J.; Meyer, R.; Meier, D.; Ettl, R. (2003): Identification and quantification of alkylketene dimers by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography/flame ionization detection. In: *JOURNAL OF PULP AND PAPER SCIENCE* 29 (1), S. 1–6.
- Odermatt, J.; Ringena, O.; Teucke, R.; Reiter, C.; Gerst, M. (2005): Quantification of styrene acrylate and urea formaldehyde resin, components of a foil impregnation resin, and polyvinylacetate by PY-GC/MS (analytical pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry). In: *APPITA JOURNAL* 58 (6), S. 462–469.
- Reinhardt, Maximilian (2017): Extraktion von „Mixed-Tropical- Hardwoods“ mittels flüssigem CO₂. Masterarbeit. Uni Hamburg, Hamburg.
- Reinhold, Tanja (2015): Papier ABC. Hg. v. verband Deutscher papierfabriken (VDP) e.V.
- Schroettke, Niklas (2016): Marker für chemotaxonomische Identifizierungen von Raminzellstoffen in Papier. Uni Hamburg, Hamburg.
- Steege, Hans ter; Vaessen, Rens W.; Cárdenas-López, Dairon; Sabatier, Daniel; Antonelli, Alexandre; Oliveira, Sylvia Mota de et al. (2016): The discovery of the Amazonian tree flora with an updated checklist of all known tree taxa. In: *Scientific reports* 6, S. 29549. DOI: 10.1038/srep29549.
- Stein, Annett (2014): Artensterben: Jedes Jahr verschwinden bis zu 58.000 Tierarten - SPIEGEL ONLINE - Wissenschaft. Hg. v. SPIEGEL ONLINE, Hamburg und Germany. Online verfügbar unter <http://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/artensterben-jaehrlich-verschwinden-58-000-tierarten-a-982906.html>, zuletzt aktualisiert am 25.07.2014, zuletzt geprüft am 16.02.2018.
- Wei, Ouyang; Xu, Xuefeng; Zhang, Yunpeng; Yang, Baijuan; Ye, Qin; Yang, Zhongliang (2017): Multidimensional Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for Fingerprinting Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Alkyl-Homologs in Crude Oil. In: *Analytical Letters* 51 (4), S. 483–495. DOI: 10.1080/00032719.2017.1341905.
- Wenig, Philip (2011): Post-optimization of Py-GC/MS data. A case study using a new digital chemical noise reduction filter (NOISERA) to enhance the data quality utilizing OpenChrom mass spectrometric software. In: *JOURNAL OF ANALYTICAL AND APPLIED PYROLYSIS* 92 (1), S. 202–208. DOI: 10.1016/j.jaap.2011.05.013.
- Wenig, Philip; Odermatt, Juergen (2010): Efficient analysis of Py-GC/MS data by a large scale automatic database approach: An illustration of white pitch identification in pulp and paper industry. In: *JOURNAL OF ANALYTICAL AND APPLIED PYROLYSIS* 87 (1), S. 85–92. DOI: 10.1016/j.jaap.2009.10.007.
- Zea, Luis; Moyano, Lourdes; Moreno, Jose A.; Medina, Manuel (2007): Aroma series as fingerprints for biological ageing in fino sherry-type wines. In: *JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE* 87 (12), S. 2319–2326. DOI: 10.1002/jsfa.2992.

8. Anhang

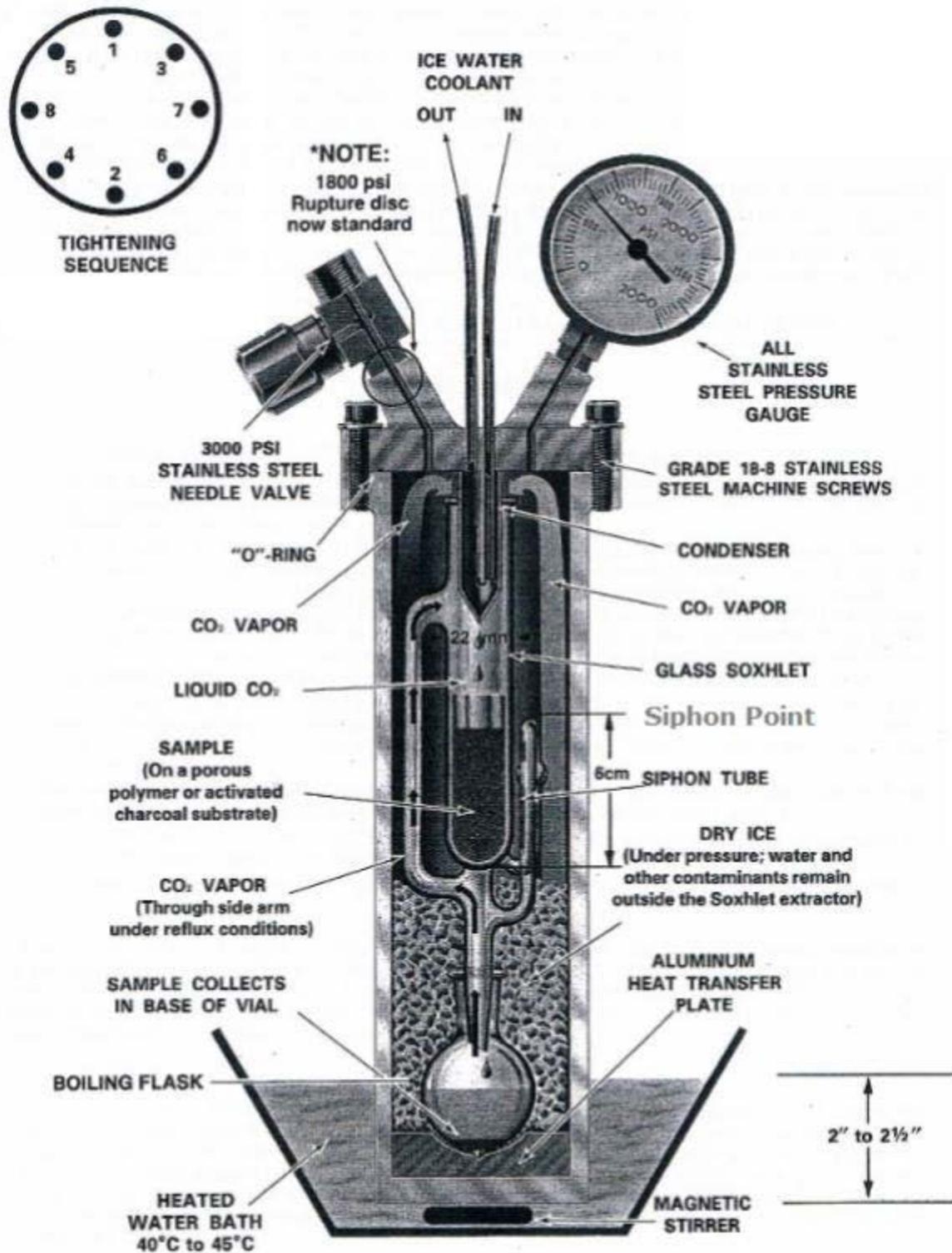


Abbildung 49: Apparatur zur Extraktion von Feststoffen mit flüssigem CO₂

936_RaminQuantifizierung								
*** Significant Ions ****								
	ID	Ion	Ret-Zeit	Fläche	Info	Startzeit	Endzeit	Weite
True	1	99	8.35	40876		8.2	8.6	0.4
True	101	58	8.35	100	mh	8.2	8.6	0.4
True	2	109	9.74	52267		9.54	9.94	0.4
True	3	58	9.74	36583		9.49	9.99	0.5
False	4	84	9.76	52799		9.56	9.96	0.4
False	6	109	9.95	104876		9.75	10.15	0.4
False	5	58	9.95	54487		9.75	10.15	0.4
True	7	68	9.96	36616		9.76	10.16	0.4
True	9	98	9.97	53991		9.77	10.17	0.4
False	8	67	10.31	51810		10.11	10.51	0.4
True	10	109	10.43	80259		10.23	10.63	0.4
False	11	67	10.43	70008		10.23	10.63	0.4
True	12	68	10.44	52613		10.24	10.64	0.4
True	14	109	10.69	50781		10.49	10.89	0.4
False	16	57	12.83	38840		12.63	13.03	0.39
True	18	51	12.84	56723		12.64	13.04	0.39
True	17	149	12.84	55860		12.64	13.04	0.39
True	103	195	14.32	1000		14.12	14.52	0.4
True	102	140	14.32	1000	mh	14.12	14.52	0.4
True	98	149	14.32	100	mh	14.12	14.52	0.4
False	99	57	14.32	100	mh	14.12	14.52	0.4
False	100	51	14.32	100	mh	14.12	14.52	0.4
True	19	50	15.32	62029		15.17	15.57	0.4
True	20	76	15.33	171734		15.18	15.58	0.4
True	21	104	15.33	145382		15.18	15.58	0.4
True	23	174	16.26	60684		16.06	16.46	0.4
True	24	147	16.27	36915		16.07	16.47	0.39
True	26	89	25.15	94848		24.95	25.35	0.4
False	27	145	25.16	51401		24.96	25.36	0.39
True	105	223	26.76	1000		26.56	26.96	0.4
True	104	149	26.76	1000	mh	26.56	26.96	0.4
True	107	282	29.16	100		28.96	29.36	0.39
True	106	134	29.71	10000	mh	29.51	29.91	0.39
True	108	234	29.71	100		29.51	29.91	0.39
True	110	257	30.84	100		30.64	30.99	0.34
True	109	137	30.84	100	mh	30.64	30.99	0.34
True	32	213	31.28	35171		31.08	31.48	0.4
True	33	178	32.08	91360		31.88	32.28	0.4
True	39	92	33.56	53865		33.36	33.76	0.39
True	48	155	38.66	37976		38.46	38.86	0.39
True	49	141	38.66	36946		38.46	38.86	0.39
True	50	299	38.68	36876		38.48	38.88	0.4
False	12	123	55.59	111967		55.39	55.79	0.39
True	55	285	59.57	50388		59.17	59.97	0.79
False	73	392	62	40639		61.7	62.3	0.59
True	89	394	64.56	63534		64.31	64.81	0.5
False	90	134	64.58	78097		64.33	64.83	0.5
True	91	128	64.58	63564		64.33	64.83	0.5
True	97	396	65.47	51412		65.22	65.72	0.5
True	96	275	65.5	48862		65.25	65.75	0.5
mh. manuell hinzugefügt								

Abbildung 50: Ionenliste für die Quantifizierung von Gonystylus spp. in MTH - Kap. 4.4.2.3, Untersuchungsnummer: 936

Tabelle 10: MTH Gattungen, die als Zellstoffe vorliegen, Stand 06.2017

	Nummer	Gattung	Familie	Handelsname
1	879-18	<i>Acacia spp.</i>	Fabacaceae-Mimosoideae	Akazie
2	853-7	<i>Alniphyllum spp.</i>	Styracaceae	Mee Dong
3	879-3	<i>Avicennia spp.</i>	Acanthaceae	Api Api
4	879-21	<i>Dendrocalamus spp.</i>	Poaceae	Bambus
5	879-16	<i>Calophyllum spp.</i>	Calophyllaceae	Bintangor
6	853-1	<i>Canarium spp.</i>	Burseraceae	Kedondong
7	853-9	<i>Castanopsis spp.</i>	Fagaceae	Berangan
8	879-14	<i>Cocos nucifera</i>	Areaceae	Kokospalme
9	879-7	<i>Dipterocarpus spp.</i>	Dipterocarpaceae	Keruing
10	879-12	<i>Durio spp.</i>	Malvaceae	Durian
11	879-1	<i>Eucalyptus spp.</i>	Myrtaceae	Eukalyptus
12	849	<i>Gonystylus spp.</i>	Thymelaeaceae	Ramin
13	879-5	<i>Heritiera spp.</i>	Malvaceae	Mengkulang
14	853-3	<i>Hevea spp</i>	Euphorbiaceae	Rubberwood
15	853-8	<i>Ilex spp.</i>	Aquifoliaceae	Holly
16	879-4	<i>Koompassia spp.</i>	Fabaceae-Caesalpinioideae	Kempas
17	879-8	<i>Lophopetalum spp.</i>	Celastraceae	Perupok
18	879-17	<i>Mangifera spp.</i>	Anacardiaceae	Ambacang (Mango)
19	879-20	<i>Intsia spp.</i>	Fabaceae-Caesalpinioideae	Merbau
20	853-6	<i>Nyssa spp.</i>	Nyssaceae	Tupelo, Nyssa
21	879-9	<i>Palaquium sp.</i>	Sapotaceae	Niato/Suntai
22	853-5	<i>Parashorea spp.</i>	Dipterocarpaceae	Gerutu
23	853-2	<i>Paulownia spp</i>	Paulowniaceae	Paulownia
24	879-2	<i>Rhizophora spp</i>	Rhizophoraceae	rote Mangrove
25	853-4	<i>Schima spp.</i>	Theaceae	Samak, Puspa
26	879-19	<i>Shorea subg. Anthoshorea</i>	Dipterocarpaceae	White Meranti
27	879-15	<i>Shorea subg. Richetia</i>	Dipterocarpaceae	Yellow Meranti
28	879-11/839	<i>Shorea subg. Rubroshorea</i>	Dipterocarpaceae	Dark/Light Red M.
29	879-10	<i>Shorea subg. Shorea</i>	Dipterocarpaceae	Bangkirai, Balau
30	879-13	<i>Swintonia spp.</i>	Anacardiaceae	Merpauh
31	879-6	<i>Tetramerista spp</i>	Tetrameristaceae	Punah

Tabelle 11: Eckpunkte zur Herstellung der Prüfblätter für den Blindversuch

Eckpunkte zum Mischen:

- **Insgesamt 15 Blindproben**
- **Pro Probe 4 Prüfblätter**
- **Alle Zellstoffe unseres Projekts sollten mindestens einmal in einer Blindprobe enthalten sein.**
- **Mindestanteil der einzelnen Zellstoffe 5%, bitte auch andere Anteile z. B. 10% und 20%.**
- **Der Buchenzellstoff dient als Matrixzellstoff, in den die anderen Zellstoffe untergemischt werden können.**
- **Die Blindproben bitte codieren, also nicht-sprechende Bezeichnungen vergeben, z. B. A, B, C, usw. (siehe vorheriger Blindtest).**
- **Angaben zur Zusammensetzung der Prüfblätter bitte zunächst geheim halten! Nach Beendigung des Blindtest werden wir die Angaben anfordern (ca. 6 Wochen später).**
- **Eine besondere Bedeutung hat die Gattung *Gonystylus* spp., da es sich um eine CITES II geschützte Gattung handelt. Bitte berücksichtigen Sie dies, indem Sie mindestens 4 Proben ansetzen, die *Gonystylus* spp. enthalten.**
- **Darüber hinaus sind die 4 *Shorea* Untergattungen wichtig, weil sie häufig vorkommen und schwer auseinander zu halten sind. Bitte achten Sie darauf, dass diese Untergattungen auch in Mischungen in den Proben enthalten sind, ähnlich den Blättern B, G und K des alten Blindtestes.**