

Ontwikkeling van een geautomatiseerde database voor houtsoorten (Diospyros) in douane monsters met hoge-resolutie massaspectrometrie



Auteur: Christiaan Oliveira Henriques

Jaar: 2021/2022

Belangrijkste gegevens

Bachelorstudent

Naam: Christiaan Oliveira Henriques

Studentnummer: S1111729

Inleverdatum: 31-05-2022

Stage instelling

Instelling: Het Douane Laboratorium

Adres: Kingsfordweg 1, 1043 GN Amsterdam

Afdeling: Organisch

Stagebegeleider: Peter Arisz P.W.F

Telefoon: 0800 0543

E-mail: laboratorium@douane.nl

Stageperiode: 1 december 2021 tot en met 31 mei 2022

Onderwijsinstelling

Instelling: Hogeschool Leiden

Adres: Zernikedreef 11, 2333 CK Leiden

Opleiding: Applied Science, Chemie

Specialisatie: Analytische Chemie

Stagedocent: Dr. Karsten Kaspers



Voorwoord

De afstudeeropdracht is geschreven in het kader van een wetenschappelijke beroepsopdracht. Deze beroepsopdracht is onderdeel van de eindfase van de opleiding analytische chemie aan de Hogeschool Leiden.

De beroepsopdracht gaat over mijn stageperiode bij het Douane Laboratorium in de periode van 1 december 2021 tot en met 31 mei 2022 op de afdeling organische chemie.

In dit afstudeerrapport zullen uitsluitend resultaten worden vermeld die zijn verkregen tijdens het onderzoek op de Thermo Scientific™ Q Exactive™ Orbitrap LCMS/MS.

Nogmaals wil ik iedereen van de afdeling organische chemie erg bedanken voor mijn leerzame en gezellige tijd op het laboratorium. Tevens wil ik Naturalis bedanken voor het delen van monsters uit hun houtcollectie. Tijdens mijn stageperiode zijn voornamelijk twee mensen heel belangrijk voor mijn leerproces geweest. Om deze reden wil ik ze daarvoor persoonlijk bedanken. Allereerst Marco Blok, de persoon die mij altijd goed heeft opgevangen op de momenten dat mijn begeleider er niet was. Tot slot wil ik Peter Arisz bedanken voor de begeleiding en de gezellige en leerzame momenten.

Abstract

At the moment, wood identification at the Customs Laboratory in the Netherlands mainly takes place on the basis of anatomical characteristics that are determined by microscopic examination. The microscopic examination experiences difficulties in determining wood species that resemble each other. For example, it is very difficult to distinguish *D. nigra* from the Diospyros family. Because the microscopic examination does not cover all types of wood, a complementary technique is desirable to identify the types of wood.

The aim of this research was therefore to create a well-functioning automated mzVault library with markers for analysis of various wood species on the HPLC-HRMS. Since wood species of the same family are related, it is expected that these species would have similar chemical structures.

Initially, it was investigated whether the methanol extracts of the two wood species could be analysed on the HPLC-HRMS, because the question asked by the Customs Laboratory was to distinguish the two wood families. The *D. nigra* wood species had a very good response to the HPLC-HRMS. In contrast, not all Diospyros species responded equally well to this technique. This study showed that 70% of the investigated species can be analysed with the HPLC-HRMS.

The second part of the research focused on finding specific components (also called markers) for the wood families with which a species can be identified. Species identification was done by the three highest chromatographic peaks. Two markers have been found for the Diospyros that occurred in almost all species. The first marker of the Diospyros family has a retention time of 5.22 minutes with an associated mass peak of m/z 175.0753 of the $[M+H]^+$ adduct $C_{11}H_{11}O_2$. The second marker is an isomeric compound. This can be seen from the two retention times. It has a retention time of 6.93 and 7.27 minutes with the same mass peak m/z 233.1172 of the $[M+H]^+$ adduct $C_{14}H_{17}O_3$. In contrast, the *D. nigra* has only one marker. The marker for the *D. nigra* has a retention time of 6.08 minutes with mass peak m/z 375.1072 of the $[M+H]^+$ adduct $C_{19}H_{19}O_8$.

After determining the markers in the wood species of the wood families, they could be added to a new mzVault library. This allowed them to be retrieved automatically using Compound Discoverer or manually in Freestyle.

Samenvatting

Op dit moment vindt houtidentificatie bij het Douane Laboratorium vooral plaats aan de hand van anatomische karakteristieken die met microscopisch onderzoek worden vastgesteld. Het microscopisch onderzoek ervaart problemen bij het vaststellen van houtsoorten die op elkaar lijken. Zo is het erg lastig om de *D. nigra* te onderscheiden van de Diospyros familie. Doordat het microscopisch onderzoek niet alle houtsoorten afdekt, is een complementaire techniek wenselijk om de houtsoorten te identificeren.

Het doel van dit onderzoek was dan ook om een goed werkende geautomatiseerde mzVault bibliotheek te creëren met markers voor analyse van diverse houtsoorten op de HPLC-HRMS. Doordat houtsoorten van dezelfde familie aan elkaar verwant zijn, wordt verwacht dat deze soorten overeenkomstige chemische structuren zouden bezitten.

Gezien de vraagstelling van het Douane Laboratorium was om de twee houtfamilies te onderscheiden, is in eerste instantie onderzocht of de methanol extracten van de twee houtsoorten geanalyseerd kon worden op de HPLC-HRMS. De *D. nigra* houtsoort had een zeer goede response op de HPLC-HRMS. Daarentegen gaven niet alle soorten Diospyros een even goede response op deze techniek. Uit deze studie kwam namelijk naar voren dat 70% van de onderzochte soorten analyseerbaar zijn met de HPLC-HRMS.

Het tweede deel van het onderzoek was gericht op het vinden van specifieke componenten, ook wel markers genoemd, voor de houtfamilies waarmee een soort geïdentificeerd kan worden. De identificatie van een soort werd gedaan aan de hand van de drie hoogste chromatografische pieken. Voor de Diospyros zijn er twee markers gevonden die in bijna alle soorten voorkwamen. De eerste marker van de Diospyros familie heeft een retentietijd van 5,22 minuten met een bijbehorende massapijk van m/z 175,0753 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{11}H_{11}O_2$. De tweede marker is een isomeren verbinding. Dit is te zien aan de twee retentietijden. Het heeft namelijk een retentietijd van 6,93 en 7,27 minuten met eenzelfde massapijk m/z 233,1172 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{14}H_{17}O_3$. Daarentegen heeft de *D. nigra* slechts één marker. De marker voor de *D. nigra* heeft een retentietijd van 6,08 minuten met massapijk m/z 375,1072 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{19}H_{19}O_8$.

Na het vaststellen van de aanwezige markers in de houtsoorten van de houtfamilies, konden deze worden toegevoegd aan een nieuwe mzVault bibliotheek. Hierdoor konden ze geautomatiseerd teruggevonden worden met behulp van Compound Discoverer of handmatige in Freestyle.

Inhoud

Voorwoord	3
Abstract	4
Samenvatting.....	5
Afkortingen.....	8
1. Inleiding	9
1.1 Achtergrondinformatie.....	9
1.1.1 Diospyros en Dalbergia.....	9
1.1.2 Relevantie van het onderzoek.....	9
1.2 Doel en onderzoeksopzet.....	10
1.3 Theoretisch kader	11
1.3.1 Q-Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™	11
1.3.2 mzVault Bibliotheek	12
1.3.3 Pareto-principe.....	13
2. Experimenteel	14
2.1 Materialen	14
2.2 Monsters	15
2.2.1 Houtextracties	15
2.3 Instrumentele analyse	15
2.4 Data-analyse	17
2.5 Methode experimenten	17
3. Resultaten.....	18
3.1 Beoordeling chromatogrammen	18
3.2 De drie hoogste chromatografische pieken	19
3.3 Geschikte houtsoorten voor analyse op de HPLC-HRMS	19
3.3.1 D. rumphii.....	20
3.3.2 D. discolor willd.	21
3.3.3 Overzicht overige Diospyros soorten	21
3.3.4 Dalbergia en Pterocarpus	22
3.3.5 Overige houtsoorten	23
3.4 Belangrijkste markers per houtsoort.....	23
3.4.1 D. rumphii.....	24
3.4.2 D. discolor willd.	24
3.4.3 Overzicht overige Diospyros markers.....	25
3.4.4 Gezamenlijke Diospyros biomarkers	26

3.4.5 Dalbergia en Pterocarpus	26
3.4.6 Markers overige houtsoorten	26
3.5 Schatting van de benodigde minimale hoeveelheid materiaal per analyse	27
3.6 Toevoegen van markers aan de mzVault bibliotheek	27
4. Discussie	28
4.1 Verschillen tussen houtsoorten.....	28
4.2 Verschillen binnen dezelfde soort Diospyros	29
5. Conclusie en aanbeveling	30
Literatuurlijst	31
Bijlagen	32
Bijlage I Aanmaken van een bibliotheek	32
Bijlage II Referentie spectrum toevoegen aan een mzVault bibliotheek.....	33
Bijlage III MzVault bibliotheek naar compound discoverer en Freestyle.....	34
Bijlage IV Mol bestand maken via ChemSketch	35
Bijlage V MSMS-spectrum genereren	36
Bijlage VI Houtsoorten geschikt voor analyse op de HRMS	37
Bijlage VII VEl wijzer	40
Bijlage VIII Hoogste chromatografische piek voor de overige Diospyros soorten.....	44
Bijlage IX Overzicht overige Diospyros markers.....	47
Bijlage X Overeenkomende Markers van de Diospyros familie gesorteerd op Rt	50
Bijlage XI Dalbergia en Pterocarpus	52
Bijlage XII Overige houtsoorten.....	54
Bijlage XIII Hoogste drie chromatografische pieken van de Diospyros soorten	57
Bijlage XIV Hoogste drie chromatografische pieken van de overige houtsoorten	59

Afkortingen

CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
API	Atmospheric pressure ionization
ESI	Elektrospray ionisatie
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRMS	High-resolution massspectrometrie
LC-MS	Liquid chromatography massa spectrometry
m/z	Massa/lading verhouding
MS	Massa spectrometrie
MWA	Methanol water (50:50 v/v%) azijnzuur
UPLC	Ultra-high-performance liquid chromatography
AGC	Automatic gain control
HESI	Heated Electrospray Ionization

1. Inleiding

'Help' schreeuwen de CITES-soorten. Net als de dodo's dat in hun tijd deden, maar daar gaf niemand op tijd gehoor aan. Voor de CITES-houtsoorten is het daarentegen nog niet te laat. Tenminste als we het kappen op tijd kunnen stoppen. Het komt namelijk helaas nog steeds voor dat deze bomen gekapt worden. Als wij als Nederlandse douane deze soorten makkelijk en snel kunnen onderscheiden van de normale bomen en wellicht met de biodiversiteit zouden kunnen bepalen waar de bomen vandaan komen, kunnen we deze bedreigde boomsoorten wellicht redden.

1.1 Achtergrondinformatie

1.1.1 Diospyros en Dalbergia

Niet elke boomsoort mag zomaar worden gekapt. CITES, voluit '*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*', is een verdrag die is ondertekend door 175 landen, waaronder Nederland, om ervoor te zorgen dat bedreigde planten- en diersoorten niet in gevaar komen. In Nederland wordt er gekeken in hoeverre de soorten beschermd dienen te worden. Dit doen ze door de soorten in drie categorieën onder te verdelen. De soorten worden onderverdeeld in Appendix I, II of III. Hierbij is Appendix I het strengst waarbij soorten niet verhandeld mogen worden. Voor Appendix II is een export- en importvergunning noodzakelijk. Tot slot is voor Appendix III alleen een importvergunning nodig[1].

CITES-soorten zijn beschermde houtsoorten waarvan de handel gehandhaafd dient te worden door de Douane. Echter is het probleem dat het soms lastig kan zijn om onderscheid te maken tussen verschillende houtsoorten. Kite *et al.* [2] hebben in hun onderzoek beschreven dat zij, met behulp van HPLC-HRMS en methanol extracten van twee Dalbergia soorten, onderscheid konden maken tussen de houtsoorten. Methanol is een geschikt oplosmiddel, omdat suikers en eiwitten hier niet goed in oplossen. Ook is methanol een goed oplosmiddel voor flavonoïden waar houtsoorten voornamelijk uit bestaan. Op deze manier werd een marker gevonden die erg specifiek is voor de D. nigra. Een marker is een component die karakteristiek is voor een bepaald monster. In het onderzoek wordt daarom geconcludeerd dat chemische analyse in combinatie met anatomisch onderzoek, overtuigend bewijs kan leveren om de positieve identificatie van onbehandeld kernhout van D. nigra te onderscheiden [2].

De Diospyros is een geslacht die bestaat uit meer dan 700 soorten van bladverliezende en groenblijvende bomen en struiken. De Diospyros of ebbenhout komt voornamelijk voor in de tropen en is een geliefde houtsoort. Dit komt doordat het hout van sommige soorten gewaardeerd wordt voor hun harde, zware, donkere hout. Andere soorten zijn geliefd om hun fruit. Deze bomen staan bekend als persimmon bomen. Ook zijn sommige nuttig als sierteelt en voor lokaal ecologisch belang [3]. Ebbenhout valt echter nog niet onder de CITES lijst. Wel ziet Naturalis dat deze soort snel aan het verdwijnen is en daarom is de verwachting dat deze soort binnenkort ook bestempeld wordt als CITES-hout.

1.1.2 Relevantie van het onderzoek

Op dit moment vindt houtidentificatie op het Douane Laboratorium vooral plaats aan de hand van anatomische karakteristieken die worden vastgesteld met microscopisch onderzoek. Daarom is een onafhankelijke chemische methode wenselijk, maar deze methode staat nog in de kinderschoenen. Kite *et al.* [2] hebben een HPLC-HRMS resultaten voor de Dalbergia nigra (CITES I) gepubliceerd. D. nigra vertoont op microscopisch vlak veel overeenkomst met enkele Diospyros (ebbenhout) soorten. In de literatuur is nauwelijks iets bekend over de Diospyros soorten en daarom zullen deze op dezelfde manier worden onderzocht als de D. nigra.

Bij de douane is het van groot belang dat houtmonsters snel gemeten kunnen worden, maar nog belangrijker is dat de data accuraat is en de conclusie snel gegeven kan worden. Jaarlijks komen

namelijk achttienduizend monsters binnen, waaronder tientallen houtmonsters. Deze komen bijvoorbeeld in de vorm van houtenbeelden binnen. Om deze hoeveelheid aan monsters op tijd af te handelen is het van belang dat de conclusie snel gesteld kan worden. Door gebruik te maken van een bibliotheek met de biomarkers voor CITES-houtensoorten, kan de computer de resultaten snel met elkaar vergelijken. Op deze manier wordt snel een indicatie verkregen of het een CITES soort betreft.

1.2 Doel en onderzoeksopzet

Het doel van dit onderzoek is om een goed werkende geautomatiseerde mzVault bibliotheek te creëren met markers voor analyse van diverse houtsoorten op de HPLC-HRMS. Om dit doel te behalen zijn de volgende deelstappen voor het onderzoeksproces opgesteld:

1. Vaststellen hoe een soort van de Diospyros familie bepaald kan worden;
2. Kwalificeren van markers in houtsoorten;
3. Het toevoegen van markers uit verkregen chromatogrammen in een mzVault bibliotheek;
4. Vaststellen of er een verwantschap tussen houtsoorten van de Diospyros familie is;
5. Bepalen wat de criteria zijn om een Diospyros soort te bevestigen.

In dit verkennend onderzoek zal een beperkte verzameling van houtreferenties gemeten worden. Binnen de verzameling zijn een aantal replica's opgenomen om de spreiding van houtmonster tot houtmonster binnen één soort te bestuderen. De methanol extracten van houtmonsters zullen gemeten worden met HPLC - hoge- resolutie massaspectrometer (HRMS). Doordat de HRMS erg laag in concentratie kan meten is zo'n 100 mg materiaal per analyse al voldoende. Als eerst wordt beoordeeld of alle houtsoorten met de HPLC-HRMS analyse van methanol extracten gemeten kunnen worden. De chromatogrammen die hieruit verkregen zijn, zullen als een LCMS-fingerprint gelden voor de geanalyseerde houtsoort. Om de fingerprint beter in beeld te krijgen, zullen de componenten worden gekarakteriseerd aan de hand van hun retentietijd (in min), $[M+H]^+$ adduct en zal het MSMS fragmentatie spectrum in een nieuwe mzVault bibliotheek worden opgeslagen. Deze componenten, ook wel markers genoemd, kunnen vervolgens per soort worden vastgesteld waardoor je een fingerprint van een houtsoort hebt. De metingen zullen uitgevoerd worden op een bestaande methode. Een marker is een component dat gemeten kan worden en specifiek is voor een bepaalde soort. Hierdoor is de identificatie van de soort mogelijk en kan bepaald worden tot welk houtsoort een monster behoort. De LCMS-fingerprint van houtsoorten kunnen variëren door verschillende oorzaken, zoals plaats.

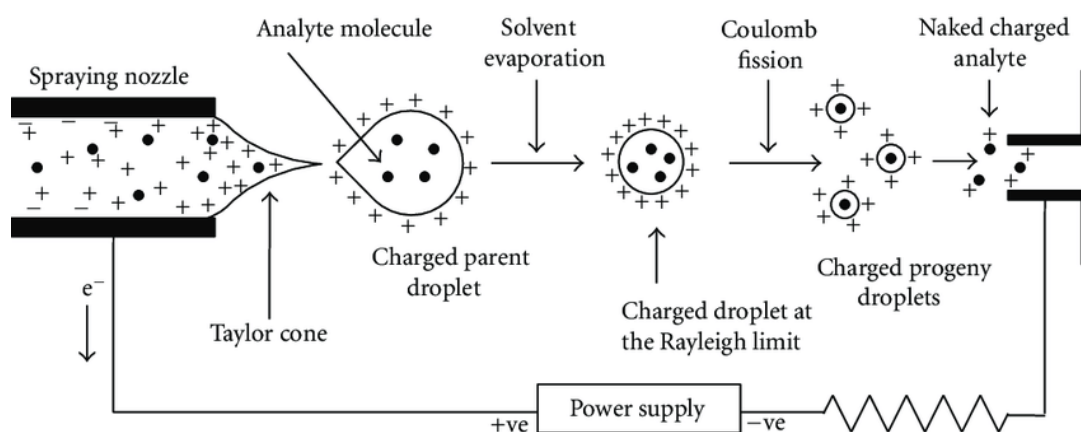
De HRMS is in staat om met elektrospay ionisatie opgeloste organische stoffen te meten. Doordat men niet precies weet waarnaar gezocht wordt, moet de gescande massarange zo groot mogelijk gehouden worden. Om complexe mengsels te analyseren is gekozen om gebruik te maken van de LC als voorscheiding. Het voordeel van de LC-voorscheiding is dat betrouwbare resultaten worden verkregen door een hoge absolute gevoeligheid per component. Hierdoor is minder houtmonster nodig en/of tijdrovende en gecompliceerde opzuiveringsstappen en kan een betere reproduceerbaarheid behaald worden. Een ander voordeel van de LC-voorscheiding is het vermogen van LC-MS om veel verschillende verbindingen in één run van elkaar te kunnen scheiden en kwantificeren [4]. In dit onderzoek is er ook gekozen om gebruik te maken van een orbitrap massaspectrometer. De orbitrap heeft namelijk een hoog oplossend vermogen en massanauwkeurigheid van <5 ppm. Dit zorgt er dan ook voor dat de orbitrap betrouwbare identificatie kan doen van verbindingen. Dit alles maakt de orbitrap dan ook zeer geschikte massa analyserator voor de identificatie van de houtanalyses voor het vinden van componenten/ markers [5].

1.3 Theoretisch kader

1.3.1 Q-Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™

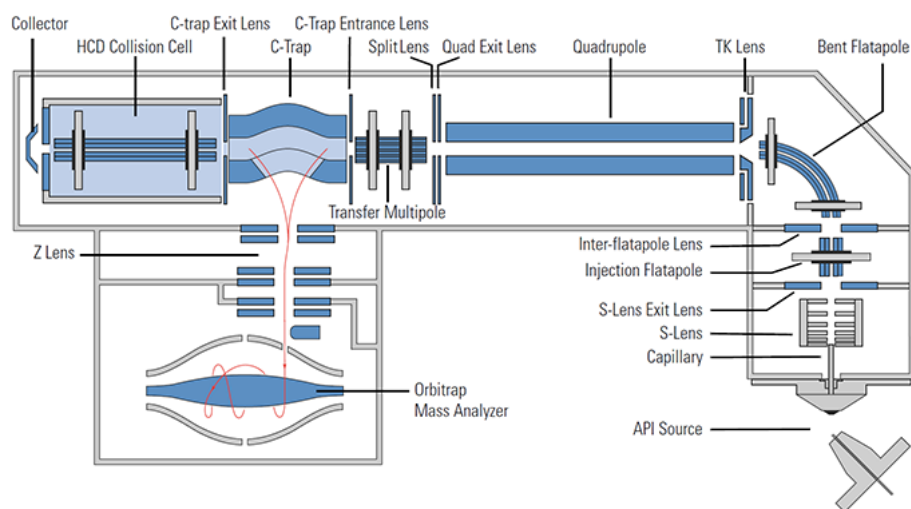
Het onderzoek werd uitgevoerd op een Vanquish-Q-Exactive series massaspectrometer HPLC-HRMS systeem. Dit is een apparaat dat werkt op basis van twee technieken, namelijk HPLC en HRMS. Massaspectrometrie is een veelzijdige techniek, maar wordt bij de douane vooral gebruikt voor identificatie van kleine hoeveelheden monsters. Doordat gebruik wordt gemaakt van een hoge resolutie worden de massapeiken scherper en hoger. Dit zorgt ervoor dat er betere detectielimieten gehaald kunnen worden.

De spectrometer die gebruikt is, is een standalone Orbitrap™ met een API-source voor LC-MS koppeling. Wanneer complexe mengsels worden gemeten op de HPLC-HRMS, worden de componenten voor gescheiden door de HPLC. De HPLC scheidt op basis van polariteit. Waarbij polaire componenten het eerst uit de kolom komen. Vervolgens worden de gescheiden componenten met de flow verder gebracht naar de massaspectrometer. De MS is een detector die de intensiteiten van de gescheiden ionenbundels secuur registreert en omzet in een massaspectrum. Hiervoor moeten de componenten worden geïoniseerd. De API-source die binnen in het systeem zit, is een electrospray ionisatie (ESI) bron [6]. Dit proces is te zien in figuur 1.



Figuur 1. Schematische afbeelding van het ESI-proces [7].

Het eluens wordt vanuit het LC-systeem naar de ESI-naald gepompt. Door het elektrisch veld tussen de naald en de API-inlaat van de massaspectrometer worden ionen aangetrokken door een tegenelektrode. Hierdoor zullen de ionen in een aangeslagen toestand terecht komen. Vervolgens ontstaat er een soort nevel van hele kleine druppels waar een desolvatie plaatsvindt en het eluens/solvent uit de druppels verwijderd wordt. Om dit proces efficiënter te laten verlopen, wordt er verwarmd stikstof aan toegevoegd. Hierdoor zal de druppel kleiner worden en dus de ladingsconcentratie in de druppel hoger worden. Wanneer de ladingsconcentratie te hoog wordt, komt het in een kritisch stadium te recht, waarna de druppels exploderen. Deze limiet wordt bereikt wanneer de elektrostatische krachten groter zijn dan de oppervlaktespanning [6].



Figuur 2. Schematische afbeelding van de Q-Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ [6].

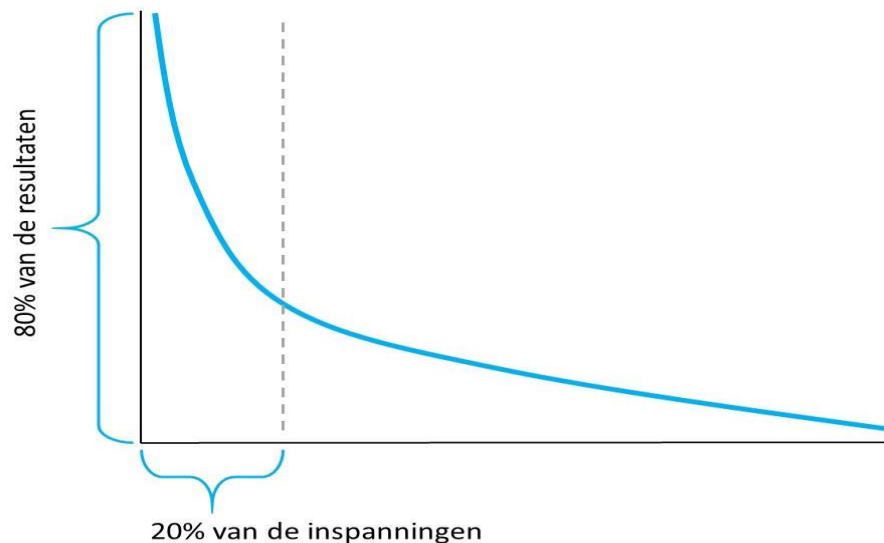
De ionen die gevormd zijn moeten nog gemeten worden. Deze worden door een verwarmd capillair in het instrument gebracht. Vervolgens worden ze door een paar S-lenzen geleid. Dan komen de ionen aan bij de Bent Flatapole waar ongeladen ionen de bocht uitvliegen en geladen ionen doorgaan. Hierna komen de ionen terecht in de quadrupole waaraan een potentiaalverschil gegeven kan worden. Hierdoor worden alleen de geselecteerde m/z -waardes doorgelaten naar de C-Trap die gevuld is met een lage druk van stikstofgas. Door botsingen met dit N_2 (g) verliezen de ionen hun kinetische energie. De ionen worden vervolgens getrapped en gestabiliseerd in het midden van de C-Trap. Vervolgens worden de ionen via de Z-Lens naar de Orbitrap massa-analysator gestuurd. Een Orbitrap is een ionenvanger en massa-analysator die bestaat uit twee onderdelen, namelijk een buitenste vatachtige elektrode en een coaxiale binnenste spilachtige elektrode. De beeldstroom van de ionen in de Orbitrap worden vervolgens omgezet in een massaspectrum met behulp van Fouriertransformatie. Er is gekozen voor een HPLC-HRMS, omdat deze een hoge massaresolutie (tot 70.000 op m/z 200), een hoge massa-accuraatheid (tot 5 ppm afwijking) en een groot dynamisch bereik heeft. Door de hoge massaresolutie in combinatie met de massa-accuraatheid zorgen ervoor dat de Orbitrap MS erg selectief is. Door de hoge gevoeligheid van de Orbitrap MS is het apparaat in staat om zeer lage concentraties te detecteren. Dit alles maakt dat de Orbitrap MS zeer geschikt voor de houtanalyses [8].

1.3.2 mzVault Bibliotheek

Een van de doelen was om te onderzoeken hoe een mzVault bibliotheek moet worden aangemaakt. In de bibliotheek kunnen de belangrijkste componenten worden opgenomen. De bibliotheek zal gemaakt worden in de software van Thermo Scientific. Het programma dat hiervoor wordt gebruikt is mzVault software version 2.2.7.47. De MOL bestanden zullen gemaakt worden met behulp van ChemSketch. Zie hiervoor bijlage IV. Wanneer de bibliotheek klaar is voor gebruik, kan deze getest worden. Voor volledig geautomatiseerde analyse kan hiervoor gebruik worden gemaakt van Compound Discoverer 3.1.1.12. Voor meer handmatige interpretaties kan gebruik worden gemaakt van FreeStyle 1.6.75.20.

1.3.3 Pareto-principe

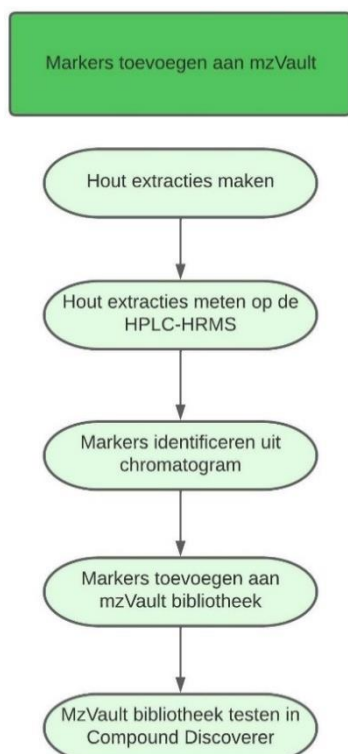
Het Pareto-principe wordt ook wel de 80-20-regel genoemd. Pareto stelt dat 20% van de variabelen (de hoogste drie pieken) al voor 80 % de uitkomst verklaren, zoals ook te zien in figuur 3. Dit wil zeggen dat de hoogste pieken de grootste invloed uitoefenen op de uitkomst. Daarom is in dit onderzoek gekozen om elk monster in eerste instantie alleen aan de hand van de hoogste drie pieken uit het HPLC-MS chromatogram te karakteriseren. De aanname die hierbij gemaakt wordt, is dat de chemische componenten van de drie hoogste pieken met hun retentietijd, m/z van het $[M+H]^+$ adduct en MSMS-spectrum voldoende specifieke informatie geven voor het vaststellen van een marker van een houtsoort. Per definitie geven de hoogste chromatografische pieken ook altijd de beste gevoeligheid om een (onbekend) houtsoort te identificeren [9].



Figuur 3. Weergave van het verloop van het Pareto-principe [9].

2. Experimenteel

Tijdens het onderzoeken was het van belang dat er componenten in de bibliotheek van mzVault werden gezet. De volgorde om een component aan de bibliotheek toe te voegen is weergegeven in de workflow schema te zien in figuur 4.



Figuur 4. Workflow voor het toevoegen van markers aan de bibliotheek en het analyseren hiervan.

De stappen die zijn aangehouden tijdens het onderzoek worden beschreven in chronologische volgorde. Als eerst werden de houtsoorten geëxtraheerd waardoor ze gemeten konden worden. Vervolgens werden ze aan de mzVault bibliotheek toegevoegd. Tot slot werden de componenten in de bibliotheek getest met behulp van Compound Discoverer. De extractie bestond uit het extraheren van de componenten in de houtmonsters voor het meten op de HRMS met ESI-bron. Voor het toevoegen van de markers aan de bibliotheek werden van de hoogste drie chromatografische pieken de retentietijd (in min) van de massapieak m/z van het $[M+H]^+$ adduct genoteerd.

2.1 Materialen

De chemicaliën die zijn gebruikt voor het uitvoeren van het onderzoek zijn weergegeven in tabel 1. Ook zijn de CAS-nummers, zuiverheden van de chemicaliën en de leveranciers vermeld. Zie bijlage VII voor de VEI wijzer.

Tabel 1. Overzicht van alle chemicaliën met hun CAS-nummer, zuiverheid en leverancier.

Naam	CAS-nummer	Zuiverheid (%)	Leverancier
Methanol	67-56-1	99,98	VWR
Acetonitril	75-05-8	99,95%	VWR
Ammonium formiaat	540-69-2	≥99%	VWR
Grade water	7732-18-5	-	VWR
Isopropyl Alcohol	67-63-0	100%	VWR
Azijszuur	64-19-7	≥99,8%	VWR
Mierenzuur	64-18-6	≥99%	VWR

2.2 Monsters

De houtsoorten die staan beschreven in dit onderzoek waren verkregen uit de Naturalis library en het Douane Laboratorium library. De keuze voor de houtsoorten was gebaseerd op lopende projecten binnen het Douane Laboratorium en Naturalis. De Diospyros houtmonsters die zijn aangeleverd door Naturalis zijn als volgt:

- D. crassiflora Hiern (5 exemplaren)
- D. discolor Willd. (6 exemplaren)
- D. ebenum J.Koenig ex Retz (6 exemplaren)
- D. ferrea (3 exemplaren)
- D. lotus (5 exemplaren)
- D. melanoxylon (5 exemplaren)
- D. perrieri (1 exemplaren)
- D. rumphii (1 exemplaren)
- D. celebica (2 exemplaren)

De Diospyros soorten werden als eerst vergeleken met enkele Dalbergia soorten. In bijlage VI staan de 60 houtmonsters uit het Douane Laboratorium library. Van de houtmonsters moesten schaafsels worden gemaakt. De schaafsels zijn verkregen met de Leica SM2010 R Sliding Microtome. Doordat het in dit onderzoek om CITES-houtsoorten gaat die beschermd zijn, mogen deze niet zomaar gekapt worden. Het referentiemateriaal is dan ook erg schaars en daarom moet er ook zuinig mee worden omgegaan. Bij het Douane Laboratorium gaat het om in beslag genomen monsters. Er is vooraf nog niet bekend om welke houtsoort het gaat. Zolang nog niet gesproken wordt van een CITES-houtsoort, is het voorwerp toegestaan en wordt deze niet vernietigd. Het is dus niet de bedoeling dat het houten beeld, stoel, fotolijst enzovoort (zwaar) beschadigd wordt bij het bemonsteren voor het aantonen van de houtsoort. Het is dan ook voor Het Douane Laboratorium van belang om te weten hoeveel gram aan houtschaafsel noodzakelijk is voor een analyse op de HRMS zodat het voorwerp zo minimaal mogelijk beschadigd wordt. Het doel was om van elk houtmonster 50 mg schaafsels te verkrijgen. Dit was echter niet bij elke soort mogelijk. Zo was het gemiddelde van de beschikbaarheid bij de D. Lotus nog geen 15mg.

2.2.1 Houtextracties

De vloeistof-hout-verhouding is bij de extractie van elke houtmonster hetzelfde gehouden. De schaafsels werden per 10 mg hout in een milliliter methanol geplaatst. De suspensies werden 30 minuten in een ultrasoonbad geplaatst, gehomogeniseerd en bij 3500 rpm voor vijf minuten af gecentrifugeerd. Van het supernatant werd 200 µl toegevoegd aan 1 ml MWA (200:1000). Van deze verdunning werd 1 µl op de HPLC-HRMS geïnjecteerd.

2.3 Instrumentele analyse

De houtanalyses werden uitgevoerd met behulp van de Q Exactive™ Focus Orbitrap LC-MS/MS die uitgerust is met een ESI-ionisatiebron. Deze bron is in staat om zowel in positieve als negatieve modus ionen te genereren. Voor dit onderzoek werd alleen gebruik gemaakt van de positieve modus. Voor de analyse werd het instrument door infusie van een kalibratiemengsel van Thermo Fisher voor positief en negatief geladen ionen gekalibreerd.

De Q Exactive™ Focus Orbitrap LC-MS/MS is uitgerust met een Thermo Vanquish™ UHPLC-systeem. Dit systeem heeft een Vanquish VC-P20 pompsysteem gekoppeld aan een Vanquish VC-A12 autosampler ingesteld op 20°C. Tijdens de metingen is gebruik gemaakt van een analytische ACQUITY

UPLC 1,8 μ m 2.1 x 100mm C18 kolom. De kolomoven temperatuur werd voor de analyses ingesteld op 40°C. Voor de mobiele fase werden verschillende solvents gebruikt, namelijk:

- A1: 500 ml MilliQ water, 5 ml 2M ammoniumformiaat buffer met 80 μ l mierenzuur
- A2: Methanol/MilliQ (50:50, v/v)
- A3: Acetonitril
- B1: 500 ml methanol, 5 ml 2M ammoniumformiaat buffer met 80 μ l mierenzuur
- B2: Methanol/MilliQ (50:50, v/v), 2,5% azijnzuur
- B3: Acetonitril/MilliQ (80:20, v/v), 0,1% mierenzuur

De softwareversies binnen de systemen zijn:

Freestyle™ 1.6.75.20	Release date: 18-04-2019
Compound Discoverer™ 3.1.1.12	Release date: 01-07-2020
mzVault 2.2.7.47	Release date: 04-03-2019
Xcalibur™ 4.3.73.11	Release date: 21-06-2019

De methode die gebruikt werd, 'HPLC-MS POS CE5070100 V1.0', is tijdens elke run hetzelfde gehouden. De flow is ook constant gehouden. De flow bedroeg 0,4 ml/min waarbij een gradiënt was toegepast van 97:3 A1:B1 van 0.0-1.0 min, 55:45 A1:B1 van 1.0-2.5 min en 0:100 A1:B1 2.5-8.5 min. Dit is tot 13.0 min gehouden op 100% B1, vervolgens is het weer teruggebracht naar de begincondities. Dit is gedaan door 97:3 van 13.0-13.1 min waarna die tot 15.0 min gehouden is op 97%A1. In figuur 5 is een schematische weergave te zien van de gradiënt die gebruikt werd en in Tabel 2 staat dit uitgeschreven.



Figuur 5. Schematische weergave van de gebruikte gradiënt voor de houtanalyse.

Tabel 2. De veranderingen van het percentage inloopploeistof B over de run.

Nr	Tijd (in min)	Flow (ml/min)	%B
1	0.000	Run	Run
2	0.000	0.400	3.0
3	1.000	0.400	3.0
4	2.500	0.400	45.0
5	8.500	0.400	100.0
6	13.000	0.400	100.0
7	13.100	0.400	3.0
8	15.000	0.400	3.0
9	15.000	Stop run	Stop run

Andere belangrijke parameters van de methode was de m/z scan range. Deze is ingesteld op een m/z van 80-1200 en de resolutie bedroeg 70.000. De MS² had verdere instellingen. Zo was de collision energies stapsgewijs ingesteld met stappen van 50, 70 en 100. De quadrupole selectie windows bedroeg 1 m/z, waarbij de fixed first mass 50 m/z was met een dynamic exclus van 5s en de resolutie bedroeg 17.500. De AGC (automatic gain control) werd ingesteld op 'high dynamic range' (1x10⁶) met een maximale injectietijd van 50ms. De parameters voor HESI-source (Heated Electrospray Ionization) werden ingesteld zoals weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3. De gebruikte parameters met hun waarde voor de HESI-source.

Parameter	positief
Sheath gas flow rate	50
Aux gas flow rate	13
Sweep gas flow rate	0
Spray voltage (kV)	3,5
Capillary temp. (°C)	320
S-lens RF level	50
Aux gas heater temp (°C)	280

2.4 Data-analyse

Nadat de monsters zijn gemeten met de HPLC-HRMS konden de chromatogrammen worden uitgewerkt met behulp van Compound DiscovererTM en FreestyleTM. Zoals eerder vermeld is in eerste instantie gekeken naar de hoogste drie pieken in het LC-MS chromatogram. Van deze drie chromatografisch pieken werd de retentietijd (in min), m/z van het [M+H]⁺ adduct en de intensiteit van de hoogste piek genoteerd. Waarna de componenten konden worden toegevoegd aan de mzVault bibliotheek. Nadat alle componenten waren toegevoegd aan de mzVault bibliotheek kon deze worden gebruikt in Compound Discoverer, voor volledig geautomatiseerde analyse, en in Freestyle, voor meer handmatige interpretaties.

2.5 Methode experimenten

Data integratie in de bibliotheek

De MS² spectra van de houtmonstercomponenten zijn opgenomen in een nieuw aangemaakte bibliotheek van mzVault. Hierbij is als eerst een naam gegeven die kan worden teruggeleid naar de houtsoort. De volgende stap in dit proces was dat de structuur formule werd ingevoerd. Vervolgens is het MS² spectrum geselecteerd waarop een recalibratie en threshold bewerking werd uitgevoerd. Nadat deze stappen zijn ondernomen werd het spectrum toegevoegd aan de nieuwe mzVault bibliotheek 'mzVault 2.3_houtcomponenten'.

Testen van de geïntrigeerde data van de bibliotheek

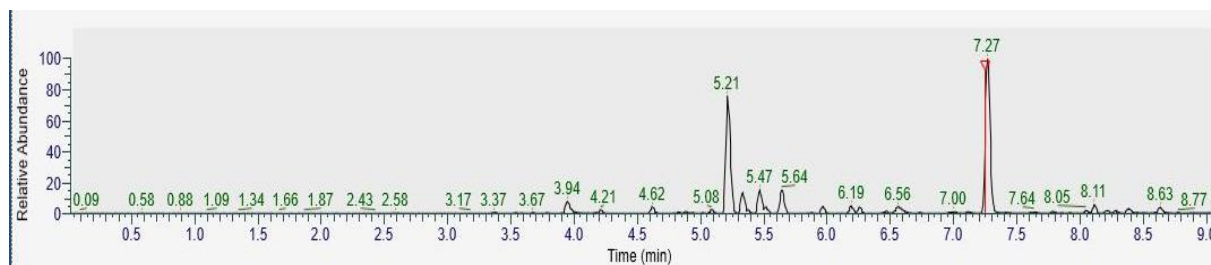
Nadat alle componenten in de bibliotheek gezet waren, werd de bibliotheek getest. De eerste stap was om de mzVault bibliotheek te importeren naar Compound Discoverer en Freestyle. Vervolgens konden de gemeten chromatogrammen van de HPLC-HRMS worden geladen in Compound Discoverer en Freestyle. Waardoor geautomatiseerd kon worden teruggezocht naar de toegevoegde markers van de mzVault bibliotheek met behulp van Compound Discoverer en handmatige in Freestyle. Hiermee kon worden gecontroleerd of de markers teruggevonden konden worden in Compound Discoverer en Freestyle.

In bijlage I staat een werkwijze omschreven hoe een bibliotheek kan worden aangemaakt. In bijlage II staat vermeld hoe een spectrum kan worden toegevoegd aan de mzVault bibliotheek. Tot slot staat in bijlage III beschreven hoe de mzVault bibliotheek kan worden gelinkt aan Compound Discoverer en Freestyle.

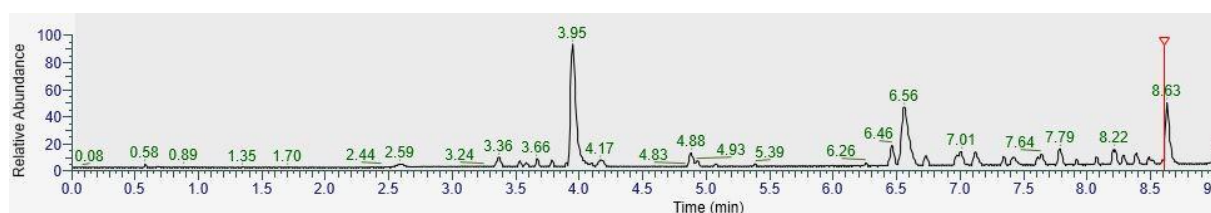
3. Resultaten

3.1 Beoordeling chromatogrammen

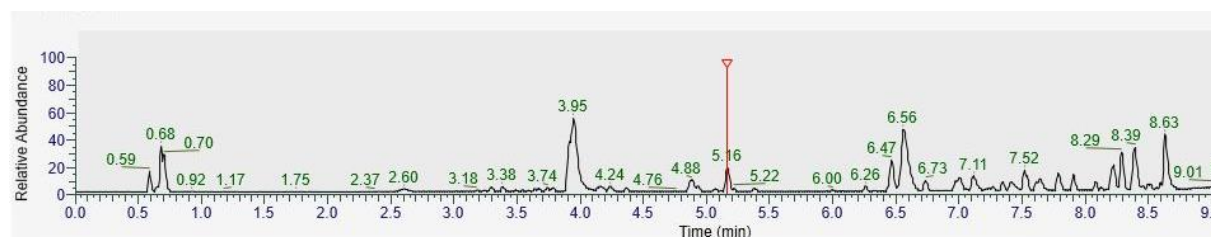
De eerste stap voor data-analyse in dit onderzoek was de beoordeling van de HPLC-HRMS chromatogrammen. Er moest namelijk bepaald worden of de houtextracten voldoende LC-MS signaal gaven. Indien dit het geval was, moest ook bepaald worden wat de belangrijkste pieken in een spectrum waren en of deze niet onder de achtergrondpieken vielen. Om de meetbaarheid te kwantificeren werd de piekintensiteit van de hoogste, niet op de achtergrond liggende, piek uit het chromatogram genomen. Zie onderstaande figuren 7 en 8 van de *D. discolor* Willd. en een blanco meting voor een voorbeeld chromatogram.



Figuur 1. Chromatogram van de *D. discolor* Willd. met lab code Tw17785.



Figuur 2. Chromatogram van de blanco meting.



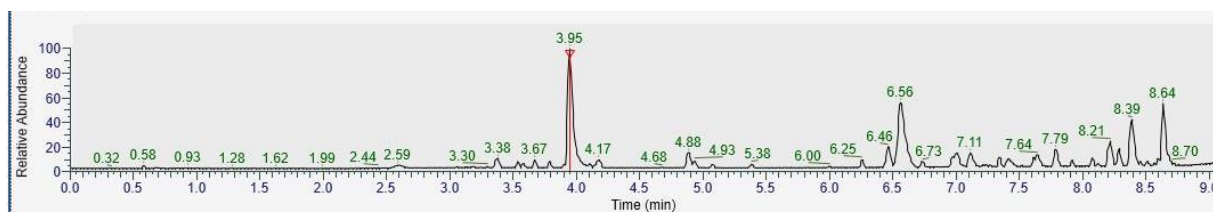
Figuur 3. Chromatogram van de *D. ferrea* met lab code L0733846.

Wanneer bovenstaande chromatogrammen met elkaar worden vergeleken (*D. discolor* Willd. en blanco monsters) zijn de componenten die aanwezig zijn in de *Diospyros* duidelijk zichtbaar. Figuur 7 toont zowel enkele grote pieken als vele kleine pieken zoals voor een complex mengsel verwacht mag worden. Aan de hand van deze markers zou deze *Diospyros* soort geïdentificeerd kunnen worden. Om de complexiteit te vereenvoudigen werd in eerste instantie alleen naar de drie hoogste pieken gekeken. In dit voorbeeld dus die met een retentietijd van 5.21, 5.64 en 7.27 min. In Excel werd van elk monster de drie hoogste pieken genoteerd met de m/z -waarde van het desbetreffende $[M+H]^+$ adduct en de retentietijd van de component [10]. Zie bijlage XIII voor de hoogste drie gemeten pieken van de *Diospyros* familie.

De HPLC-HRMS methode werkt echter niet voor elke soort *Diospyros* zo goed als in het hiervoor beschreven voorbeeld. Figuur 9 toont het chromatogram van de *D. ferrea*. Het chromatogram bevat slechts twee markers. De markers die aanwezig zijn geven kleine pieken met een retentietijd 5,16 en 0,70 min. Doordat deze chromatografische pieken zo laag uitkomen, lijkt het resultaat op het chromatogram van een blanco meting.

3.2 De drie hoogste chromatografische pieken

Het tweede onderdeel was het kunnen bevestigen van een soort aan de hand van de gevonden componenten. Tijdens dit onderzoek is er gehandeld naar het Pareto-principe waarbij in eerste instantie alleen werd gekeken naar de hoogste chromatografische pieken. Daartoe zijn per monster de drie hoogste en meest informatieve massapijken met hun m/z waarde van het $[M+H]^+$ adduct en retentietijd vastgesteld. Deze waarden zijn vervolgens opgenomen in Excel en staan vermeld in bijlage XIII. In de resultaten is te zien dat niet voor elk monster de drie hoofdcomponenten gevonden konden worden. Er zijn zelfs monsters die helemaal geen houtpieken bevatten in het chromatogram, zoals de *D. crassiflora* Hiern TW43733. Zie hiervoor figuur 10.



Figuur 10. Chromatogram van de *D. crassiflora* Hiern met lab code TW43733.

3.3 Geschikte houtsoorten voor analyse op de HPLC-HRMS

Om in aanmerking te komen voor de houtanalyse op de HRMS zal er voldoende extraheerbaar materiaal verkregen moeten worden wat ook met ESI-MS wil ioniseren. Doordat niet elke soort hetzelfde is in biodiversiteit, zijn er ook verschillen in afgeven van extraheerbaar materiaal. Om per soort te bepalen of de soorten voldoende extraheerbaar materiaal geven werd gekeken naar de intensiteit van de hoogste chromatografische piek. Deze piekintensiteit is een maat voor hoe goed de betreffende houtsoort met LC-MS gemeten kan worden.

In onderstaande Tabel 4 zijn de gemiddelde waarden voor de piekintensiteit van de hoogste piek weergegeven per soort *Diospyros*. Van de massapijke is het volgende in de tabel opgenomen: de retentietijd (in min) en de m/z waarde van het $[M+H]^+$ adduct. De tabel is gerangschikt naar afnemende intensiteit. Wanneer meerdere exemplaren van een soort verschillende componenten als hoogste piek gaven, zijn deze onderverdeeld per soort met de desbetreffende m/z waarde van het $[M+H]^+$ adduct, retentietijd (in min) en de intensiteit. Voor de volledige lijst van alle gemeten houtsoorten zie bijlage XIII.

Tabel 4. Hoogste chromatografische pieken van de *Diospyros* houtsoorten met de R_t (in min), $[M+H]^+$ adduct, m/z waarde en gemiddelde intensiteit.

Diospyros soort	R_t (in min)	$[M+H]^+$	m/z	Gemiddelde intensiteit
<i>D. rumphii</i>	7,27	$C_{14}H_{17}O_3$	233,1172	$5,54 \cdot 10^9$
<i>D. discolor</i> Willd. Marker#1	7,27	$C_{14}H_{17}O_3$	233,1172	$4,56 \cdot 10^9$
<i>D. celebica</i> Marker#1	7,27	$C_{14}H_{17}O_3$	233,1172	$4,44 \cdot 10^9$
<i>D. celebica</i> Marker#2	5,22	$C_{11}H_{11}O_2$	175,0753	$1,89 \cdot 10^9$
<i>D. discolor</i> Willd. Marker#2	5,22	$C_{11}H_{11}O_2$	175,0753	$1,33 \cdot 10^9$
<i>D. melanoxylon</i> Marker#1	5,22	$C_{11}H_{11}O_2$	175,0753	$1,32 \cdot 10^9$
<i>D. ebum</i> J.Koenig ex Retz Marker#1	5,21	$C_{11}H_{11}O_2$	175,0754	$9,68 \cdot 10^8$
<i>D. ferrea</i> Marker#1	6,92	$C_{14}H_{17}O_3$	233,1171	$6,98 \cdot 10^8$
<i>D. melanoxylon</i> Marker#2	4,74	$C_{13}H_{15}O_5$	251,0912	$4,17 \cdot 10^8$

D. ebenum J.Koenig ex Retz Marker#2	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0859	3,66*10 ⁸
D. Lotus Marker#1	4,14	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0495	2,82*10 ⁸
D. Lotus Marker#2	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0526	2,79*10 ⁸
D. melanoxydon Marker#3	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0858	2,46*10 ⁸
D. crassiflora Hiern Marker#1	5,95	C ₁₅ H ₁₇ O ₄	261,1122	2,40*10 ⁸
D. melanoxydon Marker#4	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0809	2,30*10 ⁸
D. Lotus Marker#3	0,69	C ₇ H ₈ NO ₂	138,0549	1,86*10 ⁸
D. Lotus Marker#4	3,73	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627	1,80*10 ⁸
D. melanoxydon Marker#5	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0574	1,70*10 ⁸
D. ebenum J.Koenig ex Retz Marker#3	5,97	C ₁₄ H ₁₅ O ₄	247,0966	1,66*10 ⁸
D. crassiflora Hiern Marker#2	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0707	1,64*10 ⁸
D. perrieri	5,26	C ₁₈ H ₂₇ N ₆ O ₃	375,2140	1,56*10 ⁸
D. ebenum J.Koenig ex Retz Marker#4	5,16	C ₁₄ H ₁₅ O ₅	263,0913	1,41*10 ⁸
D. suaveolens	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0577	1,37*10 ⁸
D. crassiflora Hiern Marker#3	5,40	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0760	8,57*10 ⁷
D. ebenum J.Koenig ex Retz Marker#5	5,00	C ₁₃ H ₁₁ O ₅	247,0600	7,60*10 ⁷
D. Lotus Marker#5	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0577	6,88*10 ⁷
D. ferrea Marker#2	5,16	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	191,0704	5,12*10 ⁷

De D. discolor Willd. doet het goed op de HRMS met een gemiddelde intensiteit van 4,56*10⁹ en 1,33*10⁹ voor de marker nummers 1 en 2. Echter zijn er ook soorten die een stuk minder response gaven op de HRMS, zoals; D. crassiflora Hiern. Deze soort kwam laag uit in intensiteit (marker #1 2.40*10⁸; marker# 2 1.84*10⁸). Toch liggen deze intensiteiten ruim boven de bepaalbaarheidsgrens van de HRMS die ligt op 3.60*10⁵ counts. Wanneer ook wordt gekeken naar de intensiteit van de hoogste pieken valt op dat deze een factor 100 boven de bepaalbaarheidsgrens liggen. Toch beginnen deze chromatografische pieken last te krijgen van achtergrondpieken. De achtergrondpieken beginnen namelijk hoger uit te komen dan de aanwezige componenten in het hout. Dit kan voor verwarring zorgen bij het lezen van de chromatogrammen, waardoor een blanco piek kan worden bestempeld als piek in het monster.

In de volgende deelparagrafen worden de Diospyros soorten, Dalbergia, Pterocarpus en de overige 60 houtsoorten die bestempeld zijn als look-a-likes besproken. Voor de Diospyros soorten zal dit plaatsvinden op volgorde van veel signaal met de HPLC-HRMS methode naar weinig signaal. Hierbij wordt steeds de best presterende run/monster genomen uit Tabel 4. De twee Diospyros houtsoorten met de hoogste piekintensiteiten zullen hieronder volledig worden uitgeschreven. De rest van de Diospyros soorten zullen net als de andere houtsoorten slechts kort aanbod komen.

3.3.1 D. rumphii

Tabel 5. Overzicht van de D. rumphii met de lab code, Rt (in min), [M+H]⁺ adduct, massa piek m/z en piek intensiteit.

	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massapijk m/z	Piekintensiteit
L00-0118	D. rumphii	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,47E+09
L00-0118	D. rumphii	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,57E+09
L00-0118	D. rumphii	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,57E+09

In tabel 4 is te zien dat de *D. rumphii* de beste response geeft met een intensiteit van $5,54 \cdot 10^9$. Echter was er maar één monster van deze soort beschikbaar. Dit monster komt ook uit het Douane Laboratorium houtverzameling. Er is dan ook gekozen om dit monster in triplo te meten (drie injecties uit een vial). Gezien het een herhaalbaarheidsmeting betreft, is het vanzelfsprekend dat de waardes voor de *D. rumphii* goed reproducieren. Zoals te zien in tabel 5 bedraagt de retentietijd van de hoogste piek 7,27 min en heeft de massapijk een m/z 233,1172 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{14}H_{17}O_3$. De elementsamenstellingen van de gevonden componenten komen overeen met die van flavonoïdes zoals ook door Kite *et al.* [2] geconstateerd werd. In dit onderzoek werd echter niet op de structuur ingegaan en worden markers alleen voor fingerprint doeleinden gebruikt.

Ook al was van *D. rumphii* slechts één monster beschikbaar, kan uit de hoge gemeten intensiteit van het extract worden ingeschat dat deze soort *Diospyros* geschikt is voor analyse op de HPLC-HRMS.

3.3.2 *D. discolor* Willd.

Tabel 6. Overzicht van de *D. discolor* Willd. met de lab code, R_t (in min), $[M+H]^+$ adduct, massa piek m/z en piek intensiteit.

Lab code	Specifieke benaming	R_t 1. (in min)	$[M+H]^+$	Massa piek m/z	Piek intensiteit
Tw11650	<i>D. discolor</i> Willd.	7,27	$C_{14}H_{17}O_3$	233,1171	9,53E+09
Tw17785	<i>D. discolor</i> Willd.	7,27	$C_{14}H_{17}O_3$	233,1173	2,77E+09
Tw10884	<i>D. discolor</i> Willd.	7,27	$C_{14}H_{17}O_3$	233,1173	1,39E+09
Tw17374	<i>D. discolor</i> Willd.	5,22	$C_{11}H_{11}O_2$	175,0753	5,94E+08
L0733920	<i>D. discolor</i> Willd.	5,22	$C_{11}H_{11}O_2$	175,0752	1,85E+09
Tw19574	<i>D. discolor</i> Willd.	5,22	$C_{11}H_{11}O_2$	175,0754	1,54E+09

In Tabel 4 is te zien dat de *D. Discolor* Willd. het goed doet. Hij staat hoog in de lijst en heeft dus een hoge intensiteit. Bij de metingen van zes exemplaren werden twee verschillende componenten voor de hoogste massapijk gevonden. De component met een retentietijd van 7,27 min komt gemiddeld het hoogste uit in intensiteit. De massapijk m/z die bij deze retentietijd hoort is m/z 233,1172 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{14}H_{17}O_3$ en een gemiddelde intensiteit van $4,56 \cdot 10^9$. De tweede component kwam iets lager uit in intensiteit. De intensiteit van de tweede component bedroeg $1,33 \cdot 10^9$ met een massapijk van m/z 175,0753 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{11}H_{11}O_2$. De component met een retentietijd van 7,27 min is dezelfde marker als die in hoofdstuk 3.3.1 *D. rumphii* werd gevonden.

De *D. Discolor* Willd. komt als een van de beste uit de test voor intensiteit en is daardoor geschikt voor analyse op de HPLC-HRMS. Zoals te zien in Tabel 6 zijn er twee verschillende componenten voor de hoogste intensiteit, namelijk met een retentietijd van 7,27 en 5,22 min. Dit verschil zal verder worden toegelicht in hoofdstuk 4 *discussie*.

3.3.3 Overzicht overige *Diospyros* soorten

In Tabel 7 is een overzichtelijk beeld weergegeven van de response van de verschillende *Diospyros* soorten. Aan de hand van het kleurenpatroon wordt aangegeven hoe goed een soort het doet. Waarbij de *Diospyros* soorten in het groen geanalyseerd kunnen worden op de HPLC-HRMS en waarbij *Diospyros* soorten in het rood niet analyseerbaar zijn met de huidige HPLC-HRMS methode. De overige (nog niet aanbod gekomen) *Diospyros* soorten zullen hieronder kort beoordeeld worden op intensiteit en dus analyseerbaarheid op de HPLC-HRMS.

Voor alle metingen van de *D. Celebica* zijn drie verschillende hoge massapijken gevonden in het chromatogram. De *D. celebica*, is dan ook zeer geschikt voor analyse op de HRMS.

De *D. ferrea*, *D. melanoxylon*, *D. ebenum* J.Koenig ex Retz staan zowel hoog als laag in de ranking van Tabel 4. Uit twee van de drie beschikbare *D. ferrea* monsters kan geconcludeerd worden dat deze houtsoort geschikt is voor analyse op HRMS. Van het andere monster is niet met 100 %

zekerheid te verklaren waarom deze weinig of geen signaal gaf. Zoals in de discussie staat vermeld zijn er meerdere factoren die hier mogelijk een rol bij hebben gespeeld. De *D. melanoxydon* komt hoog uit de test voor intensiteit. Ook zijn er voor alle metingen drie verschillende hoge massapijken gevonden in het chromatogram. Wel zijn er bij het vergelijken van de drie hoogste pieken wat verschillen. De *D. ferrea* en *D. melanoxydon* zijn geschikt voor analyse op de HPLC-HRMS.

De *D. ebenum* J.Koenig ex Retz komt redelijk goed uit de test voor intensiteit, echter zijn er niet voor alle metingen drie verschillende hoge massapijken gevonden in het chromatogram. De *crassiflora* Hiern komt moeizaam uit de test voor intensiteit. Er zijn dan ook niet voor alle metingen drie verschillende hoge massapijken gevonden in het chromatogram. Zoals in de Tabel in bijlage VIII te zien, heeft één monster geen pieken in het chromatogram. Doordat niet alle monsters van de *crassiflora* Hiern en *D. ebenum* J.Koenig ex Retz het goed doen (nauwelijks boven de ruis uit) is het de vraag of deze soort *Diospyros* over het algemeen goed geanalyseerd kan worden op de HPLC-HRMS.

De *D. lotus* komt moeizaam uit de test voor intensiteit. Ook zijn niet voor alle metingen drie verschillende hoge massapijken gevonden in het chromatogram. De *D. perrieri* komt laag uit de test voor intensiteit. Wel zijn voor de meting drie verschillende hoge massapijken gevonden in het chromatogram. De *D. suaveolens* komt erg laag uit de test voor intensiteit. Ook zijn er niet bij alle metingen drie verschillende hoge massapijken gevonden in het chromatogram. Doordat de componenten in de *D. perrieri*, *D. suaveolens* en de meeste componenten in de *D. lotus* nauwelijks boven de ruis uitkomen, zijn deze soorten niet geschikt voor analyse op de HPLC-HRMS.

Tabel 7. Overzicht van de *Diospyros* soorten van goed analyseerbaar op de HPLC-HRMS naar minder goed meetbaar.

Diospyros soorten	
D. rumphii	
D. discolor Willd.	
D. celebica	
D. ferrea	
D. melanoxydon	
D. ebenum J.Koenig ex Retz.	
D. crassiflora Hiern	
D. lotus	
D. perrieri	
D. suaveolens	

3.3.4 Dalbergia en Pterocarpus

Zoals eerder benoemd is het voor het Douane Laboratorium belangrijk om de *Diospyros* te kunnen onderscheiden van de *Dalbergia*, daarom zal worden bepaald of deze soorten geschikt zijn voor analyse op de HPLC-HRMS. Ook zal kort gekeken worden naar de *Pterocarpus*.

Tabel 8. Overzicht van de *Dalbergia* en *Pterocarpus* met de lab code, Rt (in min), [M+H]⁺ adduct, massa piek m/z en piek intensiteit.

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
L00-306	D. nigra donker	6,23	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299,0914	4,99E+09
L00-306	D. nigra licht	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1070	2,92E+09
L00-0077	D. retusa donker	6,12	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807	3,75E+09
L00-0077	D. retusa licht	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1073	5,99E+08
L00-0356	P. erinaceus donker	6,09	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315,0860	2,90E+09
L00-0356	P. erinaceus licht	6,37	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807	3,40E+08
L00-0309	P. erinaceus donker	6,89	C ₁₆ H ₁₇ O ₄	273,1119	2,62E+09

In Tabel 8 is goed te zien dat de onderzochte Dalbergia en Pterocarpus monsters een hoge intensiteit geven. Ook zijn er voor al deze meting drie verschillende hoge massapieken gevonden in het chromatogram. Zie hiervoor bijlage XI. De D. nigra, D. retusa en P. erinaceus zijn zeer geschikt voor analyse op de HRMS.

3.3.5 Overige houtsoorten

Op het moment dat slechts naar de Diospyros soorten wordt gekeken, geeft dit een vertekend beeld. Er zijn namelijk meer dan 40.000 houtsoorten. Om een iets breder beeld te krijgen is ervoor gekozen om de houtsoorten te vergelijken met 60 houtmonsters die volgens de microscopie erg veel op elkaar lijken en daarom lastig te onderscheiden zijn. Voor een tweede analysemethode is het wenselijk dat de methode geen problemen ervaart met het meten van houtsoorten die lastig te onderscheiden zijn door microscopie. Daarom is in eerste instantie gekeken of deze houtmonsters analyseerbaar zijn op de HPLC-HRMS. Echter zijn van deze houtsoorten voornamelijk maar één houtmonster beschikbaar. Daarom zal aan de hand van de intensiteit van slechts één houtmonster moeten worden ingeschat of de houtsoort geschikt is voor analyse op de HPLC-HRMS. In bijlage VI staat aangegeven in het rood welke monsters niet geschikt zijn voor analyse op de HPLC-HRMS en in het groen welke monsters wel geschikt zijn voor analyse op de HPLC-HRMS. Hierbij is gekeken naar de intensiteit van de massapieken. Hierop is te zien dat sommige soorten het een stuk beter doen dan andere. Zo doen de Swietenia en Entandrophagma het erg goed in tegenstelling tot de Shorea.

3.4 Belangrijkste markers per houtsoort.

In het eerste deel van de resultaten is bepaald of een soort Diospyros geschikt is voor analyse op de HPLC-HRMS. In het tweede deel van het onderzoek is aan de hand van de hoogste drie chromatografische pieken bepaald of specifieke markers aanwezig zijn waarmee de Diospyros familie kan worden achterhaald en/of er markers zijn die wijzen naar een specifieke soort Diospyros.

Diospyros biomarkers

Er is in dit onderzoek ook verder gekeken dan alleen naar individuele Diospyros soorten door naar de Diospyros familie te kijken. In een Diospyros familie zijn er onderling markers aanwezig. Deze markers worden ook wel de biomarkers genoemd van de Diospyros houtsoorten. Een biomarker is erg specifiek en makkelijk terug te vinden, doordat zijn concentratie niet tot nauwelijks verandert. Het was dan ook een prioriteit om een biomarker te vinden voor de Diospyros familie. Met deze specifieke retentietijd (in min) en massapieak m/z van het $[M+H]^+$ adduct kan namelijk meteen vanuit worden gegaan dat het om het geslacht Diospyros gaat. Ook in dit onderdeel van het onderzoek zal in eerste instantie gekeken worden naar de hoogste drie pieken in het chromatogram.

In de volgende deelparagrafen worden de Diospyros soorten, Dalbergia, Pterocarpus en de overige 60 houtsoorten die bestempeld zijn als look-a-likes besproken. Voor de Diospyros soorten zal dit plaatsvinden op volgorde van veel signaal met de HPLC-HRMS methode naar weinig signaal. Hierbij wordt steeds de best presterende run/monster genomen uit Tabel 4. De twee Diospyros houtsoorten met de hoogste piekintensiteiten zullen hieronder volledig worden uitgeschreven. De rest van de Diospyros soorten zullen net als de andere houtsoorten slechts kort aanbod komen.

3.4.1 D. rumphii

Tabel 9. Overzicht van de hoogste 3 chromatografische pieken in de D. rumphii met de lab code, Rt (in min), [M+H]⁺ adduct, massa piek m/z en piek intensiteit.

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L00-0118	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0808
L00-0118	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0808
L00-0118	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0808

In het eerste gedeelte van het onderzoek werd vastgesteld dat de D. rumphii analyseerbaar is op de HPLC-HRMS. In het tweede onderdeel zal worden vastgesteld of de D. rumphii aan de hand de markers geïdentificeerd kan worden. In Tabel 9 staan de verschillende markers aangegeven met behulp van kleuren. Voor deze soort zijn er drie markers vast gesteld die erg hoog waren in intensiteit. De markers worden beschreven naar aflopende intensiteit. De retentietijd van de hoogste piek bedraagt 7,27 min en de massapijk heeft een m/z 233,1172 van het [M+H]⁺ adduct C₁₄H₁₇O₃. De een na hoogste piek heeft een retentietijd van 5,22 min en een m/z 175,0753 van het [M+H]⁺ adduct C₁₁H₁₁O₂ en de minst hoge piek heeft een retentietijd van 5,64 min en een m/z 233,0808 van het [M+H]⁺ adduct C₁₃H₁₃O₄.

3.4.2 D. discolor willd.

Tabel 10. Overzicht van de hoogste 3 chromatografische pieken in de D. Discolor willd. met de lab code, Rt (in min), [M+H]⁺ adduct, massa piek m/z en piek intensiteit.

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
Tw11650	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0806	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753
Tw17785	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0810
Tw10884	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0755	5,65	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0809
Tw17374	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702
L0733920	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1170	4,75	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0910
Tw19574	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	5,33	C ₁₁ H ₁₁ O ₃	191,0703

Van de zes metingen zullen de hoogste drie pieken met elkaar worden vergeleken. In Tabel 10 staan de verschillende markers aangegeven met behulp van kleuren. Zoals te zien heeft de D. Discolor willd. drie verschillende markers. In dezelfde tabel is te zien dat de twee pieken met de hoogste intensiteit bij de andere metingen op bijna altijd de op een na hoogste piek is. Van de houtsoort die het als één van de beste doet voor de analyse, zijn er drie componenten gevonden die kunnen configureren voor markers. De markers zullen besproken worden naar afnemende intensiteit. De eerst marker heeft een retentietijd van 7,27 min en een massapijk m/z van 233,1172 van het [M+H]⁺ adduct C₁₄H₁₇O₃. Het tweede component die ook erg hoog uit kwam in intensiteit heeft een retentietijd van 5,22 min en een massapijk van m/z 175,0753 van het [M+H]⁺ adduct C₁₁H₁₁O₂. Deze twee pieken kwamen in alle D. Discolor wild. monsters voor. De derde component kwam in de helft van de gevallen voor en had een retentietijd van 5,64 min en een massapijk van m/z 233,0808 van

het $[M+H]^+$ adduct $C_{13}H_{13}O_4$. Wanneer wordt gekeken naar de *D. Discolor* wildd. en de *D. rumphii* blijkt dat het voor kan komen dat deze soorten dezelfde markers in dezelfde volgorde kunnen vertonen. Aan de hand van de hoogste drie chromatografische pieken blijkt dus dat er geen eenduidige identificatie mogelijk is tussen deze twee Diospyros soorten op de HPLC-HRMS.

3.4.3 Overzicht overige Diospyros markers

De volgende houtsoorten zullen besproken worden opvolgorde van veel naar weinig piekintensiteit. Zie bijlage IX voor de drie chromatografische pieken van de Diospyros soorten.

- De *D. celebica* kent drie markers voor deze soort ook al zijn er vier verschillende retentietijden.
 - De retentietijd van de eerste marker bedraagt 7,27 min en heeft een massapieak m/z 233,1172 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{14}H_{17}O_3$.
 - De tweede marker heeft een retentietijd van 5,22 min en een massapieak m/z 175,0753 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{11}H_{11}O_2$.
 - De laatste marker bestaat uit een isomeren verbinding en heeft twee retentietijden, namelijk 4,62 min en 5,47 min met een massapieak m/z 203,0702 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{12}H_{11}O_3$.
- De *D. ferrea* kent twee markers voor deze soort.
 - De eerste marker heeft een retentietijd van 6,92 min met een massapieak m/z 233,1170 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{14}H_{17}O_3$.
 - De tweede marker heeft een retentietijd van 7,26 min met een massapieak m/z 203,1064 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{13}H_{15}O_2$.
- De *D. melanoxylon* kent drie markers voor deze soort.
 - De eerste marker heeft een retentietijd van 5,22 min met een massapieak 175,0753 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{11}H_{11}O_2$.
 - De tweede marker heeft een retentietijd van 4,74 min met een massapieak van m/z 251,0913 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{13}H_{15}O_5$.
 - De derde marker heeft een retentietijd van 5,47 met een massapieak m/z 203,0702 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{12}H_{11}O_3$.
- De *D. ebenum* J.Koening ex Retz kent zeven markers voor deze soort. De drie markers met de hoogste intensiteit zullen besproken worden.
 - De eerste marker heeft een retentietijd van 5,21 min met een massapieak m/z 175,0754 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{11}H_{11}O_2$.
 - De tweede marker heeft een retentietijd van 4,74 min met een massapieak van m/z 251,0913 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{13}H_{15}O_5$.
 - De derde marker heeft een retentietijd van 5,47 met een massapieak m/z 203,0703 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{12}H_{11}O_3$.
- De *D. crassiflora* Hiern kent twee markers voor deze soort.
 - De eerste marker heeft een retentietijd van 3,05 min met een massapieak m/z 315,0708 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{13}H_{15}O_9$.
 - De tweede marker heeft een retentietijd van 3,68 min met een massapieak m/z van 467,0817 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{20}H_{19}O_{13}$.

De chromatografische pieken van de *D. Lotus*, *D. perrieri* en *D. suaveolens* zijn erg laag, hierdoor ervaren deze pieken last van achtergrondpieken. Daarom zullen deze component buiten beschouwing gelaten worden en zullen de markers niet worden meegenomen in de mzVault bibliotheek.

3.4.4 Gezamenlijke Diospyros biomarkers

De marker die het vaakst terugkomt in de metingen heeft een retentietijd van 5,22 min en een massapiekm/z 175,0753 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{11}H_{11}O_2$. De marker komt namelijk in de volgende soorten Diospyros voor: *D. discolor* Wild., *D. rumphii*, *D. celebica*, *D. melanoxylon*, *D. ebenum* J.Koenig ex Retz en de *D. ferrea*. Deze marker verwijst dan ook goed naar een gezamenlijke Biomarker. Wanneer verder wordt gekeken naar overeenkomende markers in de Diospyros soorten is een isomeren verbinding gevonden op retentietijd 6,93 min en 7,27 min met een massapiekm/z 233,1172 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{14}H_{17}O_3$. Deze marker komt in dezelfde Diospyros soorten voor als de eerder genoemde marker. Doordat ook deze marker in bijna elke soort Diospyros voorkomt, kan ook deze marker worden gezien als biomarker. Zo zijn er meerdere biomarkers voor deze soort bekend. Bijlage X geeft hiervan een overzicht weer.

3.4.5 Dalbergia en Pterocarpus

In kop 3.3.4 Dalbergia en Pterocarpus is vastgesteld dat deze hout families geanalyseerd kunnen worden op de HPLC-HRMS. Ook bij deze twee verschillende hout families zijn biomarkers voor de hout familie gevonden.

De *D. nigra* kent één markers voor deze soort. De marker heeft een retentietijd van 6,08 min met massapiekm/z 375,1072 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{19}H_{19}O_8$. De *D. retusa* kent ook slechts één marker meerdere retentietijden. Het betreft dan ook een isomeren verbinding. De marker heeft een retentietijd van 6,12 en 6,37 min met massapiekm/z 269,0807 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{16}H_{13}O_4$. De Dalbergia kent wel drie gezamenlijke biomarkers. Hiervan zal één voorbeeld gegeven worden van de marker met de hoogste intensiteit. De marker heeft een retentietijd van 6,23 min met massapiekm/z 299,0913 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{17}H_{15}O_5$. In bijlage XI staan de bijbehorende tabellen.

De *P. erinaceus* kent drie markers voor deze soort. Ook hier zal één voorbeeld worden gegeven van de marker met de hoogste intensiteit. De andere markers zijn te vinden in bijlage XI De marker heeft een retentietijd van 6,09 min met massapiekm/z 315,0859 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{17}H_{15}O_6$.

3.4.6 Markers overige houtsoorten

In dit onderdeel van het onderzoek is gekeken naar 60 houtmonsters. Waarvan voor dezelfde soort meerdere exemplaren beschikbaar waren om te kijken of er markers zijn voor deze soorten. De markers zullen kort besproken worden naar afnemende intensiteit. De *D. guianensis* kent twee markers voor deze soort. De eerste marker heeft een retentietijd van 3,34 min met massapiekm/z 144,0806 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{10}H_{10}N$. De tweede marker heeft een retentietijd van 4,39 min met een massapiekm/z van 146,0599 van het $[M+H]^+$ adduct C_9H_8NO . De *Q. petraea* kent twee markers voor deze soort. De eerste marker heeft een retentietijd van 0,66 min met een massapiekm/z 187,0575 van het $[M+H]^+$ adduct $C_4H_7N_6O_4$. De tweede marker heeft een retentietijd van 3,92 min met een massapiekm/z van 249,1119 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{14}H_{17}O_4$. De *S. spec* kent ook één marker voor deze soort. De marker heeft een retentietijd van 8,76 min met een massapiekm/z 871,3367 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{44}H_{55}O_{18}$. De *P. sp.* kent twee markers voor deze soort. De eerste marker heeft een retentietijd van 7,66 min met een massapiekm/z 285,1117 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{17}H_{17}O_4$. De tweede marker heeft een retentietijd van 5,98 min met een massapiekm/z van 237,11846 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{15}H_{25}O_2$. De *E. utile* kent twee markers voor deze soort. De eerste marker heeft een retentietijd van 8,46 min met een massapiekm/z 8343,3526 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{41}H_{56}NO_{17}$. De tweede marker heeft een retentietijd van 8,80 min met een massapiekm/z van 862,3839 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{56}H_{52}N_3O_6$. Bijlage XII geeft de bijbehorende tabellen weer. Voor de overige soorten van de 60 houtsoorten zijn elf biomarkers gevonden in verschillende hout families. Hiervan zal één voorbeeld gegeven worden van de Afzelia familie. De marker heeft een

retentietijd van 8,32 min met massapieak m/z 273,1845 van het $[M+H]^+$ adduct $C_{18}H_{25}O_2$. In bijlage XIV staan de bijbehorende tabellen.

3.5 Schatting van de benodigde minimale hoeveelheid materiaal per analyse

Uit de resultaten blijkt dat de concentratie hout voldoende is voor een analyse op de HPLC-HRMS. Voor analyse op de HPLC-HRMS werden er houtoplossingen gemaakt van 10 mg/ml. Hieruit werd 200 μ l gepipetteerd en aan 1 ml MWA toegevoegd. Dit is een verdunning van 1:6 met een totaalvolume van 1.2 ml monsteroplossing.

Voor HPLC-MS analyse zijn insert met een volume van 250 μ l beschikbaar. Wanneer een insert met 120 μ l vloeistof gevuld moet worden, is (bij een 1:6 verdunning) 20 μ l houtextract voor de sample prep nodig. Bij een concentratie van 10 mg hout per milliliter methanol komt dit overeen met een houtmonster van ≥ 0.2 mg. Wanneer dus 0.2 mg van het houtmonster wordt afgewogen en aan 20 μ l methanol wat met 0,1 ml MWA verdund is wordt toegevoegd, blijft de concentratie constant en kunnen dezelfde chromatogrammen verkregen worden.

3.6 Toevoegen van markers aan de mzVault bibliotheek

Doordat alle belangrijke informatie/gegevens, die nodig waren voor het invullen van de verplichte werkvelden van mzVault, waren bijgehouden in Excel, konden deze werkvelden worden overgenomen in mzVault. In Excel stond namelijk de massapieak vermeld, retentietijd (in min), lab code, Botanische naam en $[M+H]^+$ adduct. Van het $[M+H]^+$ adduct moest eerst wel de bruto formule van worden gemaakt.

Vervolgens moet de MSMS-spectrum worden geoptimaliseerd voor de mogelijke aanpassingen van de thresholden Recalibratie. Nadat de componenten geoptimaliseerd waren konden ze worden opgeslagen. Zie bijlage V voor een toelichting van het toevoegen van MSMS-spectra.

Op deze manier konden alle gevonden componenten worden toegevoegd aan de voor dit onderzoek aangemaakte mzVault bibliotheek 'mzVault 2.3_houtcomponenten'. In bijlage I staat beschreven hoe een bibliotheek kan worden gemaakt. In bijlage II staat beschreven hoe een spectrum kan worden toegevoegd aan de mzVault bibliotheek. De volledige bibliotheek kan ingezien worden bij het Douane Laboratorium.

4. Discussie

4.1 Verschillen tussen houtsoorten

In het eerste gedeelte van het onderzoek werd gekeken naar de intensiteit van de hoogste chromatografische pieken. Hiermee kon bepaald worden of een houtsoort geschikt is voor analyse op de HPLC-HRMS. De intensiteit hangt af van de hoeveel extraheerbaar materiaal dat een soort afgeeft, zoals in methanol oplosbare flavonoides. Soorten die weinig materiaal afgeven hebben dus een lage intensiteit op HPLC-HRMS. Uit de resultaten kan worden geconcludeerd dat niet alle soorten het even goed doen op de HPLC-HRMS. Zo zijn de *D. lotus* (vijf monsters), *D. perrieri* (één monster) en *D. suaveolens* (één monster) niet geschikt voor analyse op de HPLC-HRMS. Er zijn ook houtsoorten, zoals *D. fearra*, waarvan twee monsters een goede en één monster vrijwel geen response gaf. Enerzijds lijkt er dus een systematisch verschil per soort te zijn en anderzijds is er ook een spreiding binnen soorten waarneembaar.

Er zijn verschillende oorzaken mogelijk waardoor deze soorten weinig tot geen signaal geven, namelijk:

- De soort maakt geen extraheerbaar materiaal aan of het extraheerbare materiaal wil niet ioniseren met ESI-MS;
- De lage intensiteit kan veroorzaakt worden door verschil in leeftijd van de boom. Het kan namelijk zo zijn dat sommige chemische samenstellingen pas later van uiting komen;
- Ook kan de plaats van monstersampling van invloed zijn geweest;
- Ook kan de kleur van het hout hierbij van invloed zijn geweest. Een boom maakt namelijk jaarringen die kunnen verschillen in kleur. Zo zijn er donkere en lichtere banen. Waardoor er een verschil kan zijn in chemische samenstelling. Het verschil in houtkleur speelt met name een grote rol in de resultaten van de metingen van de *Dalbergia* en *Pterocarpus* houtsoorten. Deze soorten vertonen duidelijke verschillen in lichte en donkere banden;
- Het kan ook komen doordat het hout al heel lang geleden gekapt is waardoor er geen extraheerbaar materiaal meer van afkomt;
- Ook zou het te maken kunnen hebben gehad met de bewaaromstandigheden.

Van de tien verschillende soorten *Diospyros* gaven drie soorten *Diospyros* geen of weinig response. 70% van de *Diospyros* soorten die zijn meegenomen in het onderzoek kunnen wel succesvol gemeten worden.

4.2 Verschillen binnen dezelfde soort Diospyros

In het tweede gedeelte ging het vooral om markers te achterhalen om een soort Diospyros mee te identificeren. Hiervoor is gekeken naar alle beschikbare Diospyros monsters binnen dezelfde soort. Van de tien verschillende soorten Diospyros waren er in totaal 35 replica's beschikbaar.

Als eerst werd gekeken per Diospyros soort of de gevonden componenten teruggevonden werden in alle metingen van dezelfde soort. De *D. celebica* is de enige soort Diospyros die tijdens alle metingen van verschillende replica's dezelfde markers verkreeg. Ondanks dat de *D. rumphii* voor alle metingen dezelfde markers gaf, is deze hier buiten beschouwing gelaten, omdat hier namelijk hetzelfde monster in triplo werd gemeten. In de rest van de gevallen werden er verschuivingen en/of andere componenten in de drie hoogste chromatografische pieken binnen één Diospyros soort gevonden. Hierbij is er een verschil in intensiteit en aangetoonde componenten van hetzelfde soort Diospyros.

Het verschil in componenten kan worden veroorzaakt door:

- Het verschil in leeftijd. Het kan namelijk zo zijn dat sommige chemische samenstellingen pas later tot uiting komen.
- Ook kan de plaats van monstersampling van invloed zijn op deze verschillen. De structuur van een dikke boomstam kan anders zijn dan een tak.
- Ook kan de plaats van monstersampling van invloed zijn geweest. Een boom maakt namelijk jaarringen. De bannen kunnen verschillen in kleur. Zo zijn er zowel donkere als lichtere banen. Waardoor er een verschil kan zijn in chemische samenstelling.
- Het verschil in chemische samenstelling kan ook verklaard worden doordat een boom te maken heeft gehad met een insecten plaag. De boom kan dan zijn chemische samenstelling veranderen om de insecten te verdelgen.
- Het verschil kan ook ontstaan zijn door de plaats waar deze is opgegroeid. De bodem samenstelling kan namelijk sterk per land verschillen.
- Het kan ook komen doordat het hout al heel lang geleden gekapt is waardoor er geen extraheerbaar materiaal meer van afkomt.
- Het verschil in chemische samenstelling kan ook verklaard worden doordat een boom te maken heeft gehad met een schimmelaanval. De boom kan dan zijn chemische samenstelling veranderen om zichzelf hier tegen de beschermen.

Er zijn dus meerdere factoren die een rol kunnen spelen bij het verschil in samenstelling van componenten van hetzelfde soort Diospyros. Het is daarom raadzaam om meerdere exemplaren te meten.

5. Conclusie en aanbeveling

Het doel van dit onderzoek is om te verkennen of houtsoorten met HPLC-HRMS van methanol extracten geïdentificeerd kunnen worden. Daarbij was de taak om een werkende geautomatiseerde mzVault bibliotheek te creëren met markers voor analyse van houtsoorten op de HPLC-HRMS.

Als eerst werden de houtextracten gemeten op de HPLC-HRMS om te bepalen of de houtsoorten geschikt zijn voor analyse op de HPLC-HRMS. Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat de *D. rumphii*, *D. discolor* Willd., *D. celebica*, *D. ferrea*, *D. melanoxylon*, *D. ebenum* J.Koenig ex Retz. en *D. crassiflora* Hiern geschikt zijn voor analyse op de HPLC-HRMS. Ook zijn er soorten niet geschikt voor analyse op de HPLC-HRMS zoals de *D. lotus*, *D. perrieri* en de *D. suaveolens*.

Nadat bekend was welke soorten geschikt zijn voor analyse op de HPLC-HRMS, was het van belang om markers te identificeren voor de Diospyros familie. De twee meest voorkomende markers in de Diospyros soorten met een hoge intensiteit waren de markers met een retentietijd van 7,27 en 5,22 min. De piek op retentietijd 7,27 min geeft m/z 233,1172 voor het [M+H]⁺ adduct van C₁₄H₁₇O₃. De marker met retentietijd van 5,22 geeft m/z 175,0753 voor een [M+H]⁺ adduct van C₁₁H₁₁O₂. Deze markers zijn samen met de rest van de markers toegevoegd aan de mzVault bibliotheek. De bibliotheek kon nu succesvol worden gebruikt in Compound Discoverer voor volledig geautomatiseerde analyse en in FreeStyle voor meer handmatige interpretaties.

Echter is dit pas een kleine stap in de richting van een groot project. Daarom zijn er nog genoeg stappen te ondernemen om dit project nog succesvoller te maken. Hieronder staan dan ook aanbevelingen die kunnen worden gedaan bij verder onderzoek, namelijk:

- Zoals eerder benoemd zijn er 700 verschillende soorten ebbenhout. In dit onderzoek zijn slechts tien verschillende soorten Diospyros opgenomen. Uit deze steekproef blijkt dat de hoogste drie pieken voor piekintensiteit voldoende informatie geven voor een bepaalde houtfamilie. Doordat er zoveel verschillende soorten zijn die wellicht onderling nog aan elkaar verwant zijn, kan niet uitgesloten worden of een andere ebbenhoutsoort dezelfde drie chromatografische pieken geeft.
- Er zullen veel meer houtsoorten gemeten moeten worden. Op deze manier kan worden gekeken of er toevallige overeenkomsten bestaan tussen verschillende houtsoorten die een overeenkomstige chemische samenstelling vertonen.
- In dit onderzoek is alleen getest op onbewerkt hout uit de natuur waar niks aan gedaan is. Er moet afgevraagd worden of markers ook terug te vinden zijn in bewerkt hout. Er kunnen namelijk complicaties in de HPLC-HRMS analyse ontstaan door de lijm of coating die zijn toegepast op het hout.
- Ook zullen er meer replica's moeten worden gemeten van dezelfde soort om de spreiding in de biologische samenstelling te beoordelen. Op deze manier kan bijvoorbeeld worden vastgesteld of licht- en donkerhout verschil vertonen, of de leeftijd van de boom een rol speelt, hoelang deze al gekapt is en uit welk land het komt.
- Uit de literatuur blijkt dat veel houtanalyses snel en doeltreffend uitgevoerd kunnen worden met DART-QTOF-MS. Dit was echter niet mogelijk, omdat het Douane Laboratorium niet over dit apparaat beschikt.

Literatuurlijst

- [1] Centrum Hout, "CITES," <https://www.houtinfo.nl/bos-milieu/cites>, 2019. [Geraadpleegd op 20 januari 2022]
- [2] G. C. Kite, P. W. C. Green, N. C. Veitch, M. C. Groves, P. E. Gasson, and M. S. J. Simmonds, "Dalnigrin, a neoflavonoid marker for the identification of Brazilian rosewood (*Dalbergia nigra*) in CITES enforcement," *Phytochemistry*, vol. 71, no. 10, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.phytochem.2010.04.011. [Geraadpleegd op 20 januari 2022]
- [3] Stringfixer, "Diospyros," <https://stringfixer.com/nl/Diospyros>. [Geraadpleegd op 26 januari 2022]
- [4] T. de Rijk, P. Zomer, and W. A. Traag, "Ontwikkeling en implementatie van een LC-MS bevestigingsmethode voor de bepaling van mycotoxinen in diervoeders en diervoedergrondstoffen.," Wageningen, Jul. 2003. [Geraadpleegd op 27 januari 2022]
- [5] R. H. Perry, R. G. Cooks, and R. J. Noll, "Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 27, no. 6, Nov. 2008, doi: 10.1002/mas.20186. [Geraadpleegd op 1 februari 2022]
- [6] Creative Proteomics, "Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer," <https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm>, 2022. [Geraadpleegd op 1 februari 2022]
- [7] S. Banerjee and S. Mazumdar, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte," *International Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/282574. [Geraadpleegd op 4 februari 2022]
- [8] Thermo Scientific, "Thermo Scientific Q Exactive Focus Orbitrap LC-MS/MS System," <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/PS-64233-LC-MS-Q-Exactive-Focus-Orbitrap-PS64233-EN.pdf>. 2016. [Geraadpleegd op 4 februari 2022]
- [9] Managementmodellensite, "Pareto-principe," <https://managementmodellensite.nl/pareto-principe/>, 2022. [Geraadpleegd op 15 februari 2022]
- [10] E. L. Schymanski *et al.*, "Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence," *Environmental Science & Technology*, vol. 48, no. 4, pp. 2097–2098, Feb. 2014, doi: 10.1021/es5002105. [Geraadpleegd op 15 februari 2022]

Bijlagen

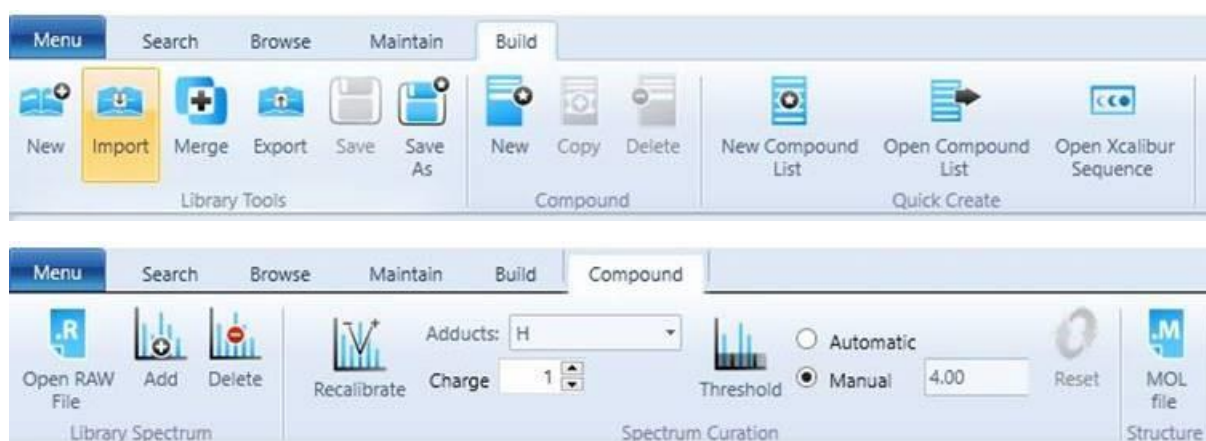
Bijlage I Aanmaken van een bibliotheek

MSMS-data van (onbekende) verbindingen die verkregen wordt bij HPLC-HRMS analyses van houtmonsters kunnen gebruikt worden als referentiechromatogram voor de betreffende houtsoorten. Voor identificatie van houtsoorten met fingerprint technieken is het niet noodzakelijk om de structuur van de gemeten verbindingen vast te stellen, zolang deze gemeten verbindingen maar betrouwbare en karakteristieke biomarkers voor de houtsoort zijn. Deze referentiedata kunnen het best opslaan opgeslagen worden in een aparte bibliotheek die vervolgens gebruikt kan worden als zoekmachine voor de identificatie van houtmonsters. In dit onderzoek is gekozen om de bibliotheek 'mzVault 2.3_houtcomponenten' aan te maken in mzVault. Om een nieuwe bibliotheek te maken, ga naar de 'build' tabblad en klik boven 'Library Tools' op 'New'. Geef de bibliotheek een herkenbare naam en sla het onder een nieuw aangemaakt mapje op 'bibliotheek spectrum'. Boven hetzelfde kopje klik op 'Save'. De bibliotheek is nu aangemaakt en kan worden gebruikt om de referentiechromatogram op te slaan.

Bijlage II Referentie spectrum toevoegen aan een mzVault bibliotheek

De bibliotheek zoek op chromatogram behorende aan een molecuulformule. Het is van belang dat nieuwe chromatogram op een correcte wijze in mzVault geplaatst worden. Dit kan gedaan worden door de volgende stappen te volgen.

Als eerst moet een verbinding met MSMS gemeten zijn om toevoegen (dit is vaak de massapijk met de hoogste intensiteit). Ga naar de 'build' tap en klik vervolgens onder het kopje compound 'New' aan. Nu wordt een blanco regel toegevoegd in 'Compound List'. Als eerst moet er worden gecontroleerd als alleen de nieuwe component is aangevinkt in het check vakje. Dit kan worden terug gevonden onder 'Library statistics'. In dien dit het geval is kan je direct aan de slag gaan. Geef de nieuwe compound een unieke naam zodat deze terug gevonden kan worden. De naam kan eventueel gewijzigd worden door dubbel klik op compound en deze een andere naam te geven. Vervolgens kan het beste de formule van deze component ingevuld worden, doe dit met hoofdletters. Voeg het spectrum aan de bibliotheek toe door in de tap naast build te klikken op compound. Nu kan het MSMS-spectrum worden toegevoegd door op 'Open RAW file' te klikken en de meting van het gewenste spectrum te selecteren. Ga naar 'filter' onder het kopje 'Chromatogram Options' en selecteer de m/z-waarde van het gewenste spectrum. Ga naar het chromatogram venster en selecteer de retentietijd (RT). In het venster 'Curated Spectrum' kan vervolgens gecontroleerd worden om welke scan met de juiste RT en de bijbehorende intensiteit het gaat van de betreffende m/z. Het systeem gebruikt een lock massa voor de recalibratie. Het systeem pakt de m/z van de geselecteerde component voor de correctie van alle pieken. Ook al wordt er in ons systeem geen gebruik gemaakt van lock massa's tijdens de metingen, heeft dit geen invloed op onze metingen of data verwerking. Voor verdere optimalisatie van het spectrum kan gebruik worden gemaakt van de threshold, deze functies staan direct onder de tab 'Compound'. Wanneer het spectrum bijgewerkt is kan deze worden toegevoegd door op 'Add' te klikken onder het kopje 'Compound'. Indien de structuur bekend is kan een MOL file van de verbinding worden aangemaakt. De mol structuren worden gemaakt in ChemSketch. De structuur kan toegevoegd worden door in dezelfde tab naar MOL file gaan en het mol bestand selecteren. De mol structuur zal vervolgens verschijnen in het venster 'MOL structure'. Vervolgens kan de component worden opgeslagen onder de 'build' tab op 'Save' te klikken.



Bijlage III MzVault bibliotheek naar compound discoverer en Freestyle

Nadat de bibliotheek is aangemaakt en alle chromatogram in aan mzVault bibliotheek zijn toegevoegd is de bibliotheek klaar voor gebruik. Ga in mzVault naar de 'build' tab, klik op 'Save As' en sla de bibliotheek op onder het juiste mapje 'bibliotheek spectrum' met de correcte naam op. Een bibliotheek toevoegen aan compound discoverer wordt gedaan door te klikken op de tab 'List en Libraries' en 'Spectral Libraries' te selecteren. Ga vervolgens bovenin naar 'Import' en selecteer de gemaakte bibliotheek. De bibliotheek is nu toegevoegd aan compound discoverer. Om de bibliotheek te gebruiken dient deze geselecteerd te worden in de study en analysis die gebruikt wordt. Ga in de study naar 'Workflows'. Ga in de Workflow Three naar de node 'Search mzVault'. In de Show Advanced Parameters staat onder het kopje 'Search Settings'. Klik op mzVault Library. Er verschijnen 3 puntjes. Klik op de drie puntjes om de gemaakte bibliotheek te selecteren. In compound discoverer is er geen limiet aan het aantal geselecteerde bibliotheken. Hou het aantal bibliotheken zo beknopt mogelijk anders zorgt het voor onnodig rekenen. Klik vervolgens op 'Save' onder workflow en sla de aangepaste workflow op met in de naam de gebruikte bibliotheek. De bibliotheek is op deze manier helemaal ingesteld in compound discoverer.

Voor freestyle gaat het instellen iets anders. Ga naar het tab 'Workspace Processing' en selecteer mzVault Search. Onder de info bar verschijnt nu de tab 'mzVault Search'. Onder het stukje 'Search List' staat Library met weer drie puntjes. Klik hierop om de desbetreffende bibliotheek te selecteren. De bieb wordt nu bij elke zoekactie aangeroepen. Echter kan er maar een bibliotheek per keer geselecteerd worden.

Bijlage IV Mol bestand maken via ChemSketch

Doordat mzVault zelf niet over een structuren tekenprogramma beschikt werd er gebruik gemaakt van ChemSketch. In ChemSketch kan je op 2 manieren structuren maken. De snelste manier is wanneer je de SMILES notatie weet. Ga naar tabblad 'Tools' ga vervolgens naar Generate en klik vervolgens op Structure from SMILES. In het verschenen venster kan je nu de SMILE notatie invullen waarna ChemSketch het molecuul genereert. Een andere manier is om de component zelf te tekenen doe dit in het tabblad 'structure'. Ga in beide gevallen naar het tabblad 'Tools' en vervolgens naar Generate en kies vervolgens voor SMILES Notation. Tot slot kan de structuur opgeslagen worden. Doe dit onder het tabblad 'File' ga naar Save As. Vervolgens moet het bestand een naam krijgen geef het de naam van de structuur. Ga bij Opslaan als naar MDL Extended molfiles zodat het wordt opgeslagen als een MOL bestand die geïmporteerd kan worden naar mzVault.

Bijlage V MSMS-spectrum genereren

Tijds het voor onderzoek is er gekeken hoe MSMS-spectrums van vast gestelde chemische structuren in een bibliotheek gezet konden worden. Hiervoor is er begonnen met 500 vast gestelde monsters die opgeslagen zijn in de bibliotheek van het Douane Laboratorium. Om geen onderscheid te maken in wanneer welk monster gemeten wordt is er via Excel een random list gegenereerd. Er werden 10 componenten per keer bij elkaar op gelost. Door dat het systeem erg laag kan meten was een klein spatelpuntje voldoende materiaal, omdat het hier ging om zeer zuivere monsters. Doordat het hier om bekende componenten ging kon er makkelijk naar de m/z plus gezocht worden. De reeksen werden met verschillende energieën gemeten namelijk: 50, 70 ,100.

Om een goed beeld te krijgen van de beste energie niveaus voor de ionisatie van de componenten. Werd er gekeken naar de piek area's van de componenten. Waarbij hoe hoger de piek area en hoe meer componenten er terug konden worden gevonden hoe geschikter de energie niveau. Vervolgens is er gekeken naar de MS² spectrums van de verkregen data. De spectrums die zijn verkregen van de reeksen zijn vervolgens per component toegevoegd aan de bibliotheek. Per component is ook het MOL bestand aan toegevoegd. Toen dit allemaal in de bibliotheek was gezet kon de bibliotheek getest worden met behulp van Freestyle en Compound Discoverer. De gemaakte bibliotheek werd getest over alle ionisatie technieken. Dit werd gedaan om te kijken of het alleen zou werken bij het spectrum van de geselecteerde energie niveau of/ en het zou werken om de componenten te vinden met andere energie niveaus als de compound ook zou terug vinden op andere energie niveaus.

Bijlage VI Houtsoorten geschikt voor analyse op de HRMS

Lab code	Specifieke benaming	Rt. 1.	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
LOO-0008	A. africana	5,56	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0753	2,89E+08
LOO-0009	A. quanzensis	4,03	C ₉ H ₇ N ₆ O	215,0677	1,29E+08
LOO-0012	A. pachyloba	8,32	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	273,1846	1,60E+08
LOO-0011	A. bipindensis	3,30	C ₁₅ H ₁₅ O ₅	275,0910	7,17E+08
LOO-0037	S. seminis	3,76	C ₂₈ H ₂₁ O ₆	453,1326	2,69E+08
LOO-0038	S. guiso	3,83	C ₃₄ H ₂₉ O ₁₂	629,1638	1,08E+08
LOO-0039	S. atricernosa				
LOO-0042	S. laevifolia	0,73	C ₁₆ H ₉ O	217,0678	1,16E+08
LOO-0044	D. guianensis	3,72	C ₁₁ H ₉ O ₂	169,0760	2,89E+08
LOO-0046	D. guianensis	3,34	C ₁₀ H ₁₀ N	144,0806	3,33E+08
LOO-0048	B. pendula	8,58	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	295,2262	2,48E+08
LOO-0054	F. sylvatica	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0525	1,85E+08
LOO-0055	N. dierrichii	4,03	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O ₂	227,0814	9,02E+08
LOO-0067	V. amaricana	8,45	C ₂₁ H ₂₉ O ₄	345,2058	7,93E+08
LOO-0068	Canarium sp.	0,67	C ₅ H ₁₂ NO ₂	118,0862	2,10E+08
LOO-0069	C. microchaete	8,07	C ₂₀ H ₂₅ O ₃	313,1796	1,94E+09
LOO-0076	A. quanzensis	8,32	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	273,1847	1,38E+08
LOO-0080	D. celebica	5,23	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	2,19E+09
LOO-0089	D. lotus	4,90	C ₂₂ H ₂₅ O ₇	401,1588	4,78E+08
LOO-0100	Q. rubra	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576	2,92E+08
LOO-0104	Q. petraea	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576	2,18E+08
LOO-0105	Q. petraea	0,66	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0575	1,85E+08
LOO-0108	Q. mongolica	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1120	1,88E+08
LOO-0110	Q. infectoria	0,70	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523	4,36E+08
LOO-0116	F. pennsylvanica	0,67	C ₄ H ₉ N ₆ O ₄	205,0679	3,62E+08

LOO-0117	A. platanoides	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0522	2,72E+08
LOO-0119	E. gunnii	13,28	C ₂₉ H ₄₉ O	413,3776	8,90E+07
LOO-0132	H. flavum	6,28	C ₁₇ H ₁₇ O ₅	301,1067	5,31E+09
LOO-0137	O. rodiaei	6,77	C ₁₅ H ₁₅ O ₃	243,1013	1,33E+09
LOO-0147	U. div	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576	5,51E+07
LOO-0174	C. sp	7,94	C ₂₈ H ₄₃ N ₆ O ₃	511,3388	2,08E+08
LOO-0186	D. alatus	10,15	C ₂₈ H ₄₅ N ₆ O	481,3650	1,89E+08
LOO-0202	T. suberba	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0575	1,22E+08
LOO-0215	S. spec	3,41	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	291,0859	9,83E+08
LOO-0217	S. spec	8,76	C ₄₄ H ₅₅ O ₁₈	871,3366	1,81E+09
LOO-0218	K. ivorensis	8,47	C ₄₁ H ₅₆ NO ₁₇	834,3531	2,97E+09
LOO-0245	S. specimen	7,95	C ₂₈ H ₄₃ N ₆ O ₃	511,3388	1,72E+08
LOO-0254	I. sp.	4,13	C ₁₂ H ₅ N ₆ O ₂	265,0447	7,49E+07
LOO-0267	P. angolensis	5,22	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315,0856	2,95E+09
LOO-0291	G. ehie	0,69	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0682	4,04E+08
LOO-0298	P. sp.	7,67	C ₁₇ H ₁₇ O ₄	285,1117	3,88E+09
LOO-0299	P. sp.	7,66	C ₁₇ H ₁₇ O ₄	285,1118	2,35E+09
LOO-0308	M. scleroxylon	6,47	C ₁₇ H ₁₅ O ₄	283,0959	5,22E+09
LOO-0316	Z. paraensis	6,37	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	271,0960	1,26E+09
LOO-0317	C. villosum	4,36	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209,0807	7,40E+07
LOO-0327	C. glabrum	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523	4,80E+08
LOO-0335	P. nigra	3,74	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627	8,29E+07
LOO-0362	H. brasiliensis	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523	1,95E+08
LOO-0365	S. lanceolatum	8,25	C ₁₆ H ₂₃ O ₄	279,1588	1,21E+09
LOO-0372	E. cylindricum	8,81	C ₃₉ H ₅₆ N ₇ O ₁₅	862,3834	5,52E+08
LOO-0374	E. cylindricum	8,59	C ₄₂ H ₆₀ NO ₁₇	850,3840	1,12E+09
LOO-0376	H. excelsum	6,27	C ₁₇ H ₁₇ O ₅	301,1067	2,50E+09
LOO-0393	E. utile	8,46	C ₄₁ H ₅₆ NO ₁₇	834,3530	2,29E+09

LOO-0394	E. utile	8,46	C ₅₀ H ₄₄ N ₉ O ₄	834,3523	1,64E+09
LOO-0404	T. mynnecophila	3,92	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O	213,1021	3,70E+08
LOO-0421	E. angolense	8,46	C ₃₇ H ₅₂ N ₇ O ₁₅	834,3525	1,32E+09
LOO-0422	G. spp.	0,75	C ₇ H ₁₄ NO ₂	144,1019	2,93E+09
LOO-0429	B. arborea	6,76	C ₂₀ H ₂₃ O ₄	327,1587	3,42E+09
LOO-0485	D. malabarica	6,33	C ₃₀ H ₄₅ O ₅	485,3258	1,63E+08
LOO-0488	G. conjugata	0,69	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0682	8,42E+07

Bijlage VII VEI wijzer

Nr. 1.	Mierenzuur (CH ₂ O ₂) CAS nr.64-18-6
Molmassa	46,03 g/mol
Dichtheid	1,22 g/ cm ³
Kookpunt	100°C
Gevaren	Licht ontvlambaar, corrosief bijtend en giftig Ontvlambare vloeistof (cat. 3), Acute toxiciteit oraal (cat. 4), Acute toxiciteit inademing (cat. 3), Huidcorrosie/-irritatie (Sub-cat. 1A) en Ernstig oogletsel (Cat 1)
Preventie	Dampen, aerosol niet inademen. Vermijd contact met de stof. Zorg voor voldoende ventilatie. Verwijderd houden van warmte en ontstekingsbronnen. Handschoenen gebruiken.
EHBO/ opruiming	Inademing → in frisse lucht staan. Contact huid → verontreinigde kleding uit trekken. Contact ogen → uitspoelen. Inslikken → water drinken, niet braken. Opruiming → opnemen en verwijderen in afvalvat 1
Nr. 2.	Methanol (CH ₄) CAS nr. 67-56-1
Molmassa	32,04 g/mol
Dichtheid	0,792 kg/l
Kookpunt	64,7°C
Gevaren	Licht ontvlambaar, giftig en gezondheidsgevaar op lange termijn Ontvlambare vloeistoffen (Cat 2), Acute toxiciteit, Oraal, Inademing en Huid (Cat 3) en Specifieke doelorgaantoxiciteit - eenmalige blootstelling (Cat 1)
Preventie	Dampen, aerosol niet inademen. Vermijd contact met de stof. Zorg voor voldoende ventilatie. Verwijderd houden van warmte en ontstekingsbronnen. Handschoenen gebruiken.
EHBO/ opruiming	Inademing → in frisse lucht staan. Contact huid → verontreinigde kleding uit trekken. Spoelen met water.

Contact ogen → uitspoelen.
 Inslikken → water drinken, na een uur laten braken.
 Opruiming → opnemen en verwijderen in afvalvat 1

Nr. 3.	Acetonitrile (C ₂ H ₃ N) CAS nr. 75-05-8
Molmassa	41,05 g/mol
Dichtheid	0,792 kg/l
Kookpunt	81°C
Gevaren	Giftig en ontvlambaar Ontvlambare vloeistoffen (Cat2), Acute toxiciteit, Oraal en Huid (Cat4), Acute toxiciteit, Inademing (Cat 3) en Oogirritatie (Cat 2)
Preventie	Voorkom inademing. Vermijd contact met de stof. Zorg voor voldoende ventilatie. Verwijderd houden van warmte en ontstekingsbronnen.
EHBO/ opruiming	Inademing → in frisse lucht staan Contact huid → verontreinigde kleding uittrekken Contact ogen → uitspoelen Inslikken → water laten drinken maximaal 2 glazen Opruiming → Opnemen en verwijderen zonder stofvorming te veroorzaken afvalvat 3
Nr. 4.	Isopropyl Alcohol (C ₃ H ₈ O) CAS nr. 67-63-0
Molmassa	60.10 g/mol
Dichtheid	0,785 g/ml
Kookpunt	82°C
Gevaren	Licht ontvlambaar en schadelijke stoffen Ontvlambare vloeistoffen (Cat 2), Oogirritatie (Cat 2) en Specifieke doelorgaantoxiciteit- Centrale Zenuwstelsel (Cat 3)
Preventie	Dampen, aerosol niet inademen. Vermijd contact met de stof. Zorg voor voldoende ventilatie. Verwijderd houden van warmte en ontstekingsbronnen. Handschoenen gebruiken.

EHBO/ opruiming Inademing → in frisse lucht staan.
 Contact huid → verontreinigde kleding uit trekken. Spoelen met water.
 Contact ogen → uitspoelen.
 Inslikken → water drinken, na een uur laten braken.
 Opruiming → opnemen en verwijderen in afvalvat 1

Nr. 5. Azijnzuur (C2H4O2)CAS 64-19-7

Molmassa 60,05 g/mol

Dichtheid 1,06 g/cm³

Kookpunt 117,9 °C

Gevaren Licht ontvlambaar en corrosief
 Ontvlambare vloeistoffen (Cat 3),
 Huidcorrosie/-irritatie (Sub-cat 1A) en
 Ernstig oogletsel (Cat 1)

Preventie Dampen, aerosol niet inademen. Vermijd contact met de stof. Zorg voor voldoende ventilatie. Verwijderd houden van warmte en ontstekingsbronnen. Handschoenen gebruiken.

EHBO/ opruiming Inademing → in frisse lucht staan.
 Contact huid → verontreinigde kleding uit trekken. Spoelen met water.
 Contact ogen → uitspoelen.
 Inslikken → water drinken en braken voorkomen.
 Opruiming → opnemen en verwijderen in afvalvat 1

Nr. 6. Ammonium formiaat (CH5NO2)CAS 540-69-2

Molmassa 63,03 g/mol

Dichtheid 1,26 g/cm³

Kookpunt 180 °C

Gevaren Schadelijke stoffen
 Oogirritatie (Cat 2)

Preventie Voorkom stofvorming. Vermijd contact met de stof. Zorg voor voldoende ventilatie.

EHBO/ opruiming

Inademing → in frisse lucht staan.

Contact huid → verontreinigde kleding uit trekken. Spoelen met water.

Contact ogen → uitspoelen.

Inslikken → gelijk water drinken niet meer dan twee glazen.

Opruiming → droog opnemen en verwijderen in afvalvat 1

Bijlage VIII Hoogste chromatografische piek voor de overige Diospyros soorten

D. celebica

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
L00-0099	D. celebica	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	4,42E+09
L00-0099	D. celebica	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	4,53E+09
L00-0099	D. celebica	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	4,37E+09
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0755	1,90E+09
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	1,88E+09
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	1,88E+09
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	1,95E+09
LOO-0080	D. celebica	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	2,02E+09
LOO-0080	D. celebica	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0751	1,80E+09
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	1,78E+09

D. ferrea

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
Tw22862	D. ferrea (Willd.) Bakh.	6,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,56E+08
L03689410	D. ferrea	6,93	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1170	8,39E+08
L0733846	D. ferrea (Willd.) Bakh.	5,16	C ₁₁ H ₁₁ O ₃	191,0703	5,51E+07

D. melanoxylon

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
TW18424	D. melanoxylon	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	1,32E+09
TW60268	D. melanoxylon	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0858	2,46E+08
TW13907	D. melanoxylon	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0809	2,30E+08
TW27410	D. melanoxylon	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	235,0574	1,70E+08
L0087841	D. melanoxylon	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0912	4,17E+08

D. ebenum J.Koenig ex Retz

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
L0079715	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	6,75E+08
U0076987	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0755	1,26E+09
U0076937	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0859	3,66E+08
L0087792	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	5,00	C ₁₃ H ₁₁ O ₅	247,0600	7,60E+07
Tw22729	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	5,97	C ₁₄ H ₁₅ O ₄	247,0966	1,66E+08
Tw36100	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	5,16	C ₁₄ H ₁₅ O ₅	263,0913	1,41E+08

D. crassiflora Hiern

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
Tw14484	D. crassiflora Hiern	5,95	C ₁₅ H ₁₇ O ₄	261,1122	2,40E+08
Tw57387	D. crassiflora Hiern	5,40	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0760	8,57E+07
Tw26875	D. crassiflora Hiern	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0710	1,47E+08
L0087782	D. crassiflora Hiern	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0705	1,80E+08
Tw43733	D. crassiflora Hiern				

D. lotus

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
U0077016	D. lotus L.	0,69	C ₇ H ₈ NO ₂	138,0549	1,86E+08
L0087832	D. lotus L.	4,14	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0496	2,24E+08
L0087830	D. lotus L.	4,14	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0495	3,40E+08
Tw42395	D. lotus L.	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0526	2,79E+08
U0077014	D. lotus L.	3,73	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627	1,80E+08
L00-0089	D. lotus	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576	6,96E+07
L00-0089	D. lotus	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0577	7,01E+07
L00-0089	D. lotus	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0579	6,68E+07

D. perrieri

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
TW57768	D. perrieri	5,26	C ₁₈ H ₂₇ N ₆ O ₃	375,2139	1,59E+08

D. suaveolens

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Piek intensiteit
L00-0095	D. suaveolens	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0577	1,37E+08
L00-0095	D. suaveolens	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0577	1,37E+08

Bijlage IX Overzicht overige Diospyros markers

D. celebica

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L00-0099	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	4,62	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701
L00-0099	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	4,61	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
L00-0099	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	4,62	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
LOO-0080	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0755	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1174	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0704
LOO-0080	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702
LOO-0080	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702
LOO-0080	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,46	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701
LOO-0080	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701
LOO-0080	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0751	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1169	4,62	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0700
LOO-0080	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	4,62	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701

D. ferrea

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
Tw22862	6,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0700	7,26	C ₁₃ H ₁₅ O ₂	203,1064
L03689410	6,93	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1170	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	7,26	C ₁₃ H ₁₅ O ₂	203,1065
L0733846	5,16	C ₁₁ H ₁₁ O ₃	191,0703	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1177			

D. melanoxydon

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
TW18424	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
TW60268	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0858	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	5,13	C ₁₄ H ₁₅ O ₆	279,0860
TW13907	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0809	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0914	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
TW27410	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	235,0574	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1175	4,36	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	209,0808
L0087841	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0912	5,46	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701	7,20	C ₁₃ H ₁₅ O ₃	219,1017

D. ebenum J.Koenig ex Retz

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L0079715	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	7,26	C ₁₃ H ₁₅ O ₂	203,1065	6,93	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172
U0076987	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0755	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0914	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0704
U0076937	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0859	5,12	C ₁₄ H ₁₅ O ₆	279,0862	5,75	C ₁₄ H ₁₅ O ₅	263,0913
L0087792	5,00	C ₁₃ H ₁₁ O ₅	247,0600	5,13	C ₁₄ H ₁₅ O ₆	279,0862	5,41	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0807
Tw22729	5,97	C ₁₄ H ₁₅ O ₄	247,0966	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1174	5,40	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,081
Tw36100	5,16	C ₁₄ H ₁₅ O ₅	263,0913	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0913	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702

D. crassiflora Hiern

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
Tw14484	5,95	C ₁₅ H ₁₇ O ₄	261,1122	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0710			
Tw57387	5,40	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0760						
Tw26875	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0710	3,69	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₃	467,0821			
L0087782	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0705	3,67	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₃	467,0814	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1175
Tw43733									

D. Lotus

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
U0077016	0,69	C ₇ H ₈ NO ₂	138,0549	3,74	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0628	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576
L0087832	4,14	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0496	0,7	C ₅ H ₁₂ N ₃ O	130,0975	3,73	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627
L0087830	4,14	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0495	0,7	C ₅ H ₁₂ N ₃ O	130,0975			
Tw42395	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0526	3,79	C ₇ H ₈ NO ₂	138,0550	4,36	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	209,0809
U0077014	3,73	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0577	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0526
L00-0089	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576						
L00-0089	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0577						
L00-0089	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0579						

D. perrieri

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
TW57768	5,26	C ₁₈ H ₂₇ N ₆ O ₃	375,2139	6,84	C ₁₈ H ₂₃ N ₆ O ₂	355,1878	4,37	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	209,0807

D. suaveolens

Lab code	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L00-0095	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0577	0,75	C ₁₀ H ₁₇ N ₆ O ₉	365,1054			
L00-0095	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0577	0,75	C ₁₀ H ₁₇ N ₆ O ₉	365,1054	3,3	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0579

Bijlage X Overeenkomende Markers van de Diospyros familie gesorteerd op Rt

Biomarker	Lab code	Specifieke benaming	Rt. (in min)	[M+H] ⁺	MASSA PIEK m/z
1	TW27410	D. melanoxylon	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1175
	L0733846	D. ferrea (Willd.) Bakh.	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1177
	L0087782	D. crassiflora Hiern	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1175
2	L0733920	D. discolor Willd.	4,75	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0910
	L0087841 en TW13907	D. melanoxylon	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0913
	Tw36100 en U0076987	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0913
3	TW60268	D. melanoxylon	5,13	C ₁₄ H ₁₅ O ₆	279,0860
	U0076937 en L0087792	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	5,12	C ₁₄ H ₁₅ O ₆	279,0862
4	LOO-0080 L00-0099	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753
	Tw11650 Tw10884 Tw17785				
	Tw17374 L0733920 Tw19574	D. discolor Willd.	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753
	L00-0118	D. rumphii	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753
	TW60268 TW18424	D. melanoxylon	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752
	U0076987 L0079715	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754
	L03689410	D. ferrea	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753
	Tw17374	D. discolor Willd.	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702
	LOO-0080	D. celebica	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
6	Tw13907 L0087841 TW18424	D. melanoxylon	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
	Tw22862	D. ferrea (Willd.) Bakh.	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0700
	Tw36100 U0076987	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
7	TW13907	D. melanoxylon	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0809
	L00-0118	D. rumphii	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0808
	Tw11650 Tw17785 Tw10884	D. discolor Willd.	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0808
8	TW60268	D. melanoxylon	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0858
	U0076937	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0859
9	L0079715	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	7,26	C ₁₃ H ₁₅ O ₂	203,1065
	L03689410 Tw22862	D. ferrea	7,26	C ₁₃ H ₁₅ O ₂	203,1064

10	L03689410 Tw22862	D. ferrea	6,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1170
	L0079715 Tw22729	D. ebenum J.Koenig ex Retz.	7,09	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173
	TW18424	D. melanoxylon	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172
	L00-0118	D. rumphii	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172
	L0733920 Tw10884 Tw17785				
	Tw17374 Tw19574 Tw11650	D. discolor Willd.	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172
	L00-0099 LOO-0080	D. celebica	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172

Bijlage XI Dalbergia en Pterocarpus

Lab code	Specifieke benaming	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L00-306	D. nigra donker	6,23	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299,0914
L00-306	D. nigra licht	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1070
L00-0077	D. retusa donker	6,12	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807
L00-0077	D. retusa licht	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1073
L00-0356	P. erinaceus donker	6,09	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315,0860
L00-0356	P. erinaceus licht	6,37	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807
L00-0309	P. erinaceus donker	6,89	C ₁₆ H ₁₇ O ₄	273,1119
L00-0309	P. erinaceus licht	6,37	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0808

D. nigra

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L00-306D	6,23	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299,0914	6,12	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1074
L00-306L	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1070	4,11	C ₁₀ H ₁₃ O ₅	213,0756			

D. retusa

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L00-0077D	6,12	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807	6,24	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299,0913	5,39	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0755
L00-0077L	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1073	6,37	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0808	0,68	C ₃ H ₇ N ₆ O ₃	175,0577

Dalbergia

Biomarker	Lab code	Specifieke benaming	Rt. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
1	L00-306D	D. nigra donker	6,23	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299,0914
	L00-0077D	D. retusa donker	6,24	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299,0913
2	L00-306D	D. nigra donker	6,12	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807
	L00-0077	D. retusa	6,24	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0808
3	L00-306	D. nigra	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1072
	L00-306L	D. retusa licht	6,08	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	375,1073

P. erinaceus

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L00-0356D	6,09	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315,0860	6,40	C ₁₇ H ₁₉ O ₅	303,1224	6,89	C ₁₆ H ₁₇ O ₄	273,1119
L00-0356L	6,37	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807	7,28	C ₁₈ H ₂₁ O ₄	301,1433	4,39	C ₁₀ H ₁₁ O ₃	179,0702
L00-0309D	6,89	C ₁₆ H ₁₇ O ₄	273,1119	6,09	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315,0859	6,37	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0807
L00-0309L	6,37	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0808	6,89	C ₁₆ H ₁₇ O ₄	273,1121	6,8	C ₁₂ H ₁₇ O ₃	209,1173

Bijlage XII Overige houtsoorten

D. guianensis

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
LOO-0044	3,72	C ₁₁ H ₉ N ₂	169,0760	3,34	C ₁₀ H ₁₀ N	144,0807	4,39	C ₉ H ₈ NO	146,0600
LOO-0046	3,34	C ₁₀ H ₁₀ N	144,0806	4,39	C ₉ H ₈ NO	146,0599	0,68	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0680

Q. petraea

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
LOO-0104	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1118	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523
LOO-0105	0,66	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0575	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1120	3,28	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576

S. spec

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
LOO-0215	3,41	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	291,0859	8,77	C ₄₄ H ₅₅ O ₁₈	871,3369			
LOO-0217	8,76	C ₄₄ H ₅₅ O ₁₈	871,3366	8,20	C ₅₅ H ₄₅ N ₂ O ₆	906,3731	8,31	C ₅₁ H ₄₁ N ₈ O ₄	829,3257

P. sp.

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
LOO-0298	7,67	C ₁₇ H ₁₇ O ₄	285,1117	5,98	C ₁₅ H ₂₅ O ₂	237,1847	6,45	C ₁₈ H ₁₉ O ₆	331,1171
LOO-0299	7,66	C ₁₇ H ₁₇ O ₄	285,1118	5,99	C ₁₅ H ₂₅ O ₂	237,1846	3,69	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₀	437,1439

E. utile

Lab code	Rt. 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt. 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
LOO-0393	8,46	C ₄₁ H ₅₆ O ₁₇ N	834,3530	7,80	C ₃₉ H ₄₆ O ₁₅ N ₇	852,3054	8,81	C ₅₆ H ₅₂ O ₆ N ₃	862,3838
LOO-0394	8,46	C ₄₁ H ₅₆ O ₁₇ N	834,3523	8,17	C ₄₀ H ₅₄ O ₁₇ N	820,3372	8,8	C ₅₆ H ₅₂ O ₆ N ₃	862,3840

Biomarkers overige houtfamilies

Biomarker	Lab code	Specifieke benaming	Rt. (in min)	[M+H] ⁺	Massa Piek m/z
1	LOO-0008	A. africana	8,32	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	273,1845
	LOO-0012	A. pachyloba	8,32	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	273,1846
2	LOO-0008	A. africana	4,78	C ₁₉ H ₁₅ N ₆ O ₇	439,0995
	LOO-0011	A. bipindensis	4,78	C ₁₉ H ₁₅ N ₆ O ₇	439,0995
3	LOO-0037	S. seminis	7,95	C ₂₇ H ₄₇ N ₂ O ₇	511,3387
	LOO-0042	S. laevifolia	7,96	C ₂₇ H ₄₇ N ₂ O ₇	511,3384
4	LOO-0038	S. guiso	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0574
	LOO-0042	S. laevifolia	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0572
5	LOO-0100	Q. rubra	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576
	LOO-0104	Q. petraea	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576
	LOO-0105	Q. petraea	0,66	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0575
	LOO-0108	Q. mongolica	0,66	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576
6	LOO-0100	Q. rubra	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576
	LOO-0104	Q. petraea	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1118

7	LOO-0105	Q. petraea	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1120
	LOO-0108	Q. mongolica	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1120
8	LOO-0104	Q. petraea	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523
	LOO-0110	Q. infectoria	0,70	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523
9	LOO-0105	Q. petraea	3,28	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576
	LOO-0108	Q. mongolica	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0574
10	LOO-0317	C. villosum	4,36	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209,0807
	LOO-0327	C. glabrum	4,37	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209,0807
11	LOO-0317	C. villosum	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576
	LOO-0327	C. glabrum	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0575
	LOO-0317	C. villosum	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523
	LOO-0327	C. glabrum	0,63	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0524

Bijlage XIII Hoogste drie chromatografische pieken van de Diospyros soorten

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Intensiteit	Rt 2. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z
L00-0118	D. rumphii	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,47E+09	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0808
L00-0118	D. rumphii	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,57E+09	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0808
L00-0118	D. rumphii	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,57E+09	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0808
Tw11650	D. Discolor willd.	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	9,53E+09	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0806	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753
Tw17785	D. Discolor willd.	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	2,77E+09	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0810
Tw10884	D. Discolor willd.	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	1,39E+09	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0755	5,65	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0809
Tw17374	D. Discolor willd.	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	5,94E+08	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702
L0733920	D. Discolor willd.	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	1,85E+09	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1170	4,75	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0910
Tw19574	D. Discolor willd.	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	1,54E+09	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	5,33	C ₁₁ H ₁₁ O ₃	191,0703
L00-0099	D. celebica	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	4,42E+09	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	4,62	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701
L00-0099	D. celebica	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	4,53E+09	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	4,61	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
L00-0099	D. celebica	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1173	4,37E+09	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	4,62	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0755	1,90E+09	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1174	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0704
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	1,88E+09	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	1,88E+09	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	1,95E+09	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,46	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701
LOO-0080	D. celebica	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	2,02E+09	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701
LOO-0080	D. celebica	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0751	1,80E+09	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1169	4,62	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0700
LOO-0080	D. celebica	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	1,78E+09	7,27	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	4,62	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701
Tw22862	D. ferrea	6,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1171	5,56E+08	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0700	7,26	C ₁₃ H ₁₅ O ₂	203,1064
L03689410	D. ferrea	6,93	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1170	8,39E+08	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	7,26	C ₁₃ H ₁₅ O ₂	203,1065
L0733846	D. ferrea	5,16	C ₁₁ H ₁₁ O ₃	191,0703	5,51E+07	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1177			
Tw18424	D. melanoxylon	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	1,32E+09	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
Tw60268	D. melanoxylon	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0858	2,46E+08	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	5,13	C ₁₄ H ₁₅ O ₆	279,0860
Tw13907	D. melanoxylon	5,64	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0809	2,30E+08	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0914	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703
Tw27410	D. melanoxylon	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	235,0574	1,70E+08	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1175	4,36	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	209,0808

L0087841	D. melanoxydon	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0912	4,17E+08	5,46	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701	7,20	C ₁₃ H ₁₅ O ₃	219,1017
	D. ebenum J.Koening										
L0079715	ex Retz	5,22	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0753	6,75E+08	7,26	C ₁₃ H ₁₅ O ₂	203,1065	6,93	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1172
	D. ebenum J.Koening										
U0076987	ex Retz	5,21	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0755	1,26E+09	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0914	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0704
	D. ebenum J.Koening										
U0076937	ex Retz	6,70	C ₁₃ H ₁₃ O ₃	217,0859	3,66E+08	5,12	C ₁₄ H ₁₅ O ₆	279,0862	5,75	C ₁₄ H ₁₅ O ₅	263,0913
	D. ebenum J.Koening										
L0087792	ex Retz	5,00	C ₁₃ H ₁₁ O ₅	247,0600	7,60E+07	5,13	C ₁₄ H ₁₅ O ₆	279,0862	5,41	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0807
	D. ebenum J.Koening										
Tw22729	ex Retz	5,97	C ₁₄ H ₁₅ O ₄	247,0966	1,66E+08	7,26	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1174	5,40	C ₁₃ H ₁₃ O ₄	233,0810
	D. ebenum J.Koening										
Tw36100	ex Retz	5,16	C ₁₄ H ₁₅ O ₅	263,0913	1,41E+08	4,74	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	251,0913	5,47	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0702
Tw14484	D. crassiflora Hiern	5,95	C ₁₅ H ₁₇ O ₄	261,1122	2,40E+08	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0710			
Tw57387	D. crassiflora Hiern	5,40	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0760	8,57E+07						
Tw26875	D. crassiflora Hiern	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0710	1,47E+08	3,69	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₃	467,0821			
L0087782	D. crassiflora Hiern	3,05	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,0705	1,80E+08	3,67	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₃	467,0814	0,70	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194,1175
Tw43733	D. crassiflora Hiern										
U0077016	D. Lotus	0,69	C ₇ H ₈ NO ₂	138,0549	1,86E+08	3,74	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0628	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576
L0087832	D. Lotus	4,14	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0496	2,24E+08	0,7	C ₅ H ₁₂ N ₃ O	130,0975	3,73	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627
L0087830	D. Lotus	4,14	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0495	3,40E+08	0,7	C ₅ H ₁₂ N ₃ O	130,0975			
Tw42395	D. Lotus	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0526	2,79E+08	3,79	C ₇ H ₈ NO ₂	138,0550	4,36	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	209,0809
U0077014	D. Lotus	3,73	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627	1,80E+08	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0577	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0526
L00-0089	D. Lotus	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576	6,96E+07						
L00-0089	D. Lotus	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0577	7,01E+07						
L00-0089	D. Lotus	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0579	6,68E+07						
Tw57768	D. perrieri	5,26	C ₁₈ H ₂₇ N ₆ O ₃	375,2139	1,59E+08	6,84	C ₁₈ H ₂₃ N ₆ O ₂	355,1878	4,37	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	209,0807
L00-0095	D. suaveolens	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0577	1,37E+08	0,75	C ₁₀ H ₁₇ N ₆ O ₉	365,1054			
L00-0095	D. suaveolens	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0577	1,37E+08	0,75	C ₁₀ H ₁₇ N ₆ O ₉	365,1054	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0579

Bijlage XIV Hoogste drie chromatografische pieken van de overige houtsoorten

Lab code	Specifieke benaming	Rt 1. (in min)	[M+H] ⁺	Massa piek m/z	Rt 2. (in min)	Formule	Massa piek m/z	Rt 3. (in min)	Formule	Massa piek m/z
LOO-0008	A. africana	5,56	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0753	8,32	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	273,1845	4,78	C ₁₉ H ₁₅ N ₆ O ₇	439,0995
LOO-0009	A. quanzensis	4,03	C ₉ H ₇ N ₆ O	215,0677	5,57	C ₁₂ H ₁₈ NO ₃	224,1282	8,4	C ₁₈ H ₂₇ O ₃	291,1953
LOO-0012	A. pachyloba	8,32	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	273,1846	8,53	C ₁₈ H ₂₇ O ₂	275,2004	8,25	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	277,2161
LOO-0011	A. bipindensis	3,30	C ₁₅ H ₁₅ O ₅	275,0910	4,78	C ₁₉ H ₁₅ N ₆ O ₇	439,0995	5,56	C ₁₄ H ₇ N ₆ O ₃	307,0574
LOO-0037	S. seminis	3,76	C ₂₈ H ₂₁ O ₆	453,1326	7,95	C ₂₇ H ₄₇ N ₂ O ₇	511,3387	3,83	C ₃₄ H ₃₂ NO ₁₂	646,1910
LOO-0038	S. guiso	3,83	C ₃₄ H ₂₉ O ₁₂	629,1638	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0574	0,68	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0678
LOO-0039	S. atricernosa									
LOO-0042	S. laevifolia	0,73	C ₁₆ H ₉ O	217,0678	7,96	C ₂₇ H ₄₇ N ₂ O ₇	511,3384	3,3	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0572
LOO-0044	D. guianensis	3,72	C ₁₁ H ₉ O ₂	169,0760	3,34	C ₁₀ H ₁₀ N	144,0807	4,39	C ₉ H ₈ NO	146,0600
LOO-0046	D. guianensis	3,34	C ₁₀ H ₁₀ N	144,0806	4,39	C ₉ H ₈ NO	146,0599	0,68	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0680
LOO-0048	B. pendula	8,58	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	295,2262	5,65	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2215	3,53	C ₁₇ H ₂₉ N ₂ O ₁₅	501,1567
LOO-0054	F. sylvatica	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0525	0,75	C ₁₀ H ₁₇ N ₆ O ₉	365,1050	2,91	C ₁₂ H ₁₅ N ₆ O ₇	355,0998
LOO-0055	N. dierrichii	4,03	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O ₂	227,0814	3,92	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O	213,1022	6,60	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O	211,0865
LOO-0067	V. amaricana	8,45	C ₂₁ H ₂₉ O ₄	345,2058	7,52	C ₂₁ H ₃₁ O ₅	363,2163	8,47	C ₂₂ H ₃₃ O ₅	377,2318
LOO-0068	C. sp.	0,67	C ₅ H ₁₂ NO ₂	118,0862	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0575	0,75	C ₇ H ₁₄ NO ₂	144,1019
LOO-0069	C. microchaete	8,07	C ₂₀ H ₂₅ O ₃	313,1796	6,35	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0806	7,11	C ₁₉ H ₂₃ O ₃	299,1639
LOO-0076	A. quanzensis	8,32	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	273,1847	8,53	C ₁₈ H ₂₇ O ₂	275,2003	4,78	C ₁₉ H ₁₅ N ₆ O ₇	439,0993
LOO-0080	D. celebica	5,23	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0752	7,25	C ₁₄ H ₁₇ O ₃	233,1170	5,45	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0701
LOO-0089	D. lotus	4,90	C ₂₂ H ₂₅ O ₇	401,1588	13,34	C ₂₉ H ₄₉ O	413,3770	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0572

LOO-0100	Q. rubra	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576	3,74	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0628
LOO-0104	Q. petraea	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1118	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523
LOO-0105	Q. petraea	0,66	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0575	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1120	3,28	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576
LOO-0108	Q. mongolica	3,92	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	249,1120	0,66	C ₄ H ₇ N ₆ O ₃	187,0576	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0574
LOO-0110	Q. infectoria	0,70	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523	3,39	C ₉ H ₉ N ₆ O ₄	265,0681	3,90	C ₂₅ H ₃₁ N ₆ O ₁₀	5775,2100
LOO-0116	F. pennsylvanica	0,67	C ₄ H ₉ N ₆ O ₄	205,0679	4,03	C ₂₉ H ₄₀ NO ₁₅	642,2380	0,75	C ₁₀ H ₁₇ N ₆ O ₉	365,1047
LOO-0117	A. platanoides	0,67	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0522	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0573	3,73	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0624
LOO-0119	E. gunnii	13,28	C ₂₉ H ₄₉ O	413,3776	7,29	C ₁₄ H ₂₁ O	205,1587	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576
LOO-0132	H. flavum	6,28	C ₁₇ H ₁₇ O ₅	301,1067	6,35	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0805	7,33	C ₁₈ H ₁₉ O ₅	315,1223
LOO-0137	O. rodiaei	6,77	C ₁₅ H ₁₅ O ₃	243,1013	8,07	C ₃₀ H ₂₅ O ₆	481,1643	3,71	C ₂₀ H ₂₁ O ₅	341,1380
LOO-0147	U. div	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576	7,55	C ₁₅ H ₁₇ O ₂	229,1223	6,81	C ₁₅ H ₂₁ O ₃	249,1485
LOO-0174	C. sp	7,94	C ₂₈ H ₄₃ N ₆ O ₃	511,3388	6,98	C ₁₃ H ₂₉ O ₄	249,2059	3,43	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	329,0863
LOO-0186	D. alatus	10,15	C ₂₈ H ₄₅ N ₆ O	481,3650	7,47	C ₁₅ H ₂₅ O ₂	237,1848	9,14	C ₂₇ H ₄₃ O ₃	415,3203
LOO-0202	T. suberba	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0575	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0524	3,74	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627
LOO-0215	S. spec	3,41	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	291,0859	8,77	C ₄₄ H ₅₅ O ₁₈	871,3369			
LOO-0217	S. spec	8,76	C ₄₄ H ₅₅ O ₁₈	871,3366	8,20	C ₅₅ H ₄₅ N ₂ O ₆	906,3731	8,31	C ₅₁ H ₄₁ N ₈ O ₄	829,3257
LOO-0218	K. ivorensis	8,47	C ₄₁ H ₅₆ NO ₁₇	834,3531	8,81	C ₅₆ H ₅₂ N ₃ O ₆	862,3838	7,81	C ₄₃ H ₅₀ NO ₁₇	852,3058
LOO-0245	S. specimen	7,95	C ₂₈ H ₄₃ N ₆ O ₃	511,3388	3,42	C ₁₂ H ₁₁ N ₆ O ₇	351,0683	0,69	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0682
LOO-0254	I. sp.	4,13	C ₁₂ H ₅ N ₆ O ₂	265,0447	8,40	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	273,1846	4,38	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303,0497
LOO-0267	P. angolensis	5,22	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315,0856	6,88	C ₁₆ H ₁₇ O ₄	273,1118	5,88	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299,0911
LOO-0291	G. ehie	0,69	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0682	3,38	C ₁₂ H ₁₂ NO ₄	234,0761	2,73	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄	222,0761
LOO-0298	P. sp.	7,67	C ₁₇ H ₁₇ O ₄	285,1117	5,98	C ₁₅ H ₂₅ O ₂	237,1847	6,45	C ₁₈ H ₁₉ O ₆	331,1171

LOO-0299	P. sp.	7,66	C ₁₇ H ₁₇ O ₄	285,1118	5,99	C ₁₅ H ₂₅ O ₂	237,1846	3,69	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₀	437,1439
LOO-0308	M. scleroxylon	6,47	C ₁₇ H ₁₅ O ₄	283,0959	6,31	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	299,0910	6,10	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0805
LOO-0316	Z. paraensis	6,37	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	271,096	5,73	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0752	7,02	C ₂₀ H ₁₇ O ₅	337,1065
LOO-0317	C. villosum	4,36	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209,0807	3,29	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0576	0,63	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0524
LOO-0327	C. glabrum	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523	4,37	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209,0807	3,30	C ₈ H ₇ N ₆ O ₃	235,0575
LOO-0335	P. nigra	3,74	C ₈ H ₇ N ₆ O ₂	219,0627	10,99	C ₂₉ H ₄₉ O ₂	429,3726	11,16	C ₃₃ H ₅₅ N ₆ O ₄	599,4278
LOO-0362	H. brasiliensis	0,69	C ₄ H ₇ N ₆ O ₄	203,0523	4,14	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0495	9,59	C ₁₇ H ₃₃ N ₆ O ₂	353,2660
LOO-0365	S. lanceolatum	8,25	C ₁₆ H ₂₃ O ₄	279,1588	7,32	C ₁₅ H ₂₇ O ₃	255,1952	0,65	C ₅ H ₁₀ NO ₃	132,0655
LOO-0372	E. cylindricum	8,81	C ₃₉ H ₅₆ N ₇ O ₁₅	862,3834	8,80	C ₄₂ H ₅₈ N ₇ O ₁₅	864,3987	8,62	C ₅₅ H ₅₀ N ₃ O ₆	848,3688
LOO-0374	E. cylindricum	8,59	C ₄₂ H ₆₀ NO ₁₇	850,3840	8,67	C ₄₅ H ₆₄ NO ₁₉	922,4051	8,80	C ₃₉ H ₅₈ N ₇ O ₁₅	865,4030
LOO-0376	H. excelsum	6,27	C ₁₇ H ₁₇ O ₅	301,1067	6,90	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285,0755	6,35	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	269,0805
LOO-0393	E. utile	8,46	C ₄₁ H ₅₆ NO ₁₇	834,3530	7,80	C ₃₉ H ₄₆ N ₇ O ₁₅	852,3054	8,81	C ₅₆ H ₅₂ N ₃ O ₆	862,3838
LOO-0394	E. utile	8,46	C ₅₀ H ₄₄ N ₉ O ₄	834,3523	8,17	C ₄₀ H ₅₄ NO ₁₇	820,3372	8,80	C ₅₆ H ₅₂ N ₃ O ₆	862,3840
LOO-0404	T. mynnecophila	3,92	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O	213,1021	6,61	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O	211,0865	0,74	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0681
LOO-0421	E. angolense	8,46	C ₃₇ H ₅₂ N ₇ O ₁₅	834,3525	8,81	C ₄₃ H ₆₀ NO ₁₇	862,3842	8,17	C ₄₀ H ₅₄ NO ₁₇	820,3373
LOO-0422	G. spp.	0,75	C ₇ H ₁₄ NO ₂	144,1019	4,00	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O	210,1601	0,69	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0680
LOO-0429	B. arborea	6,76	C ₂₀ H ₂₃ O ₄	327,1587	5,24	C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,1328	4,84	C ₁₃ H ₁₇ O ₄	237,1118
LOO-0485	D. malabarica	6,33	C ₃₀ H ₄₅ O ₅	485,3258	7,32	C ₃₀ H ₄₇ O ₇	519,3309	0,71	C ₇ H ₈ NO ₂	138,0549
LOO-0488	G. conjugata	0,69	C ₅ H ₉ N ₆ O ₄	217,0682	2,74	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄	222,0761	4,87	C ₈ H ₁₉ O ₃	163,1329