

CODEN: IBBRAH (14-78) 1-20 (1978)

INSTITUUT VOOR BODEMVRUCHTBAARHEID

RAPPORT 14-78

DE CHEMISCHE VORM WAARIN Ni EN Co VOORKOMEN IN HET FLOEEMEXUDAAT VAN
RICINUS COMMUNIS

door

D. WIERSMA

1978

Instituut voor Bodemvruchtbaarheid, Oosterweg 92, Haren (Gr.)

Inst. Bodemvruchtbaarheid, Rapp. 14-78 (1978) 20 pp.

INHOUD

| | |
|-------------------------|----|
| Inleiding | 3 |
| Materialen en methoden | 5 |
| Resultaten en discussie | 7 |
| Samenvatting | 16 |
| Literatuur | 17 |
| Bijlagen | 18 |

INLEIDING

De toenemende belasting van het milieu met zware metalen maakt het nodig hun mobiliteit in de plant te bestuderen. Van de chemische vorm tijdens het transport in de plant is vrij weinig bekend, vooral in het floëem. Als de zware metalen gebonden vervoerd worden, kan de bindingsvorm aanwijzingen geven om tot regulatie van het transport te komen. Door verandering van de bemesting zou dan geprobeerd kunnen worden om het transport van zware metalen te beperken of, als het om relatieve tekorten aan spoorelementen gaat, tot een betere verdeling te komen.

Tiffin (1967, 1971, 1972) heeft veel onderzoek gedaan naar de bindingsvormen van zware metalen in het xyleem. In het xyleemexudaat van zonnebloem, sojaboon, tomaat en komkommer heeft hij met behulp van papierelectroforese Fe-citraat aangetoond. Cu en Zn worden als negatief geladen verbindingen vervoerd, terwijl Ni tot een bepaalde concentratie alleen als negatief geladen verbinding voorkomt en daarboven ook als positief geladen verbinding. De concentratie waarbij Ni behalve naar de anode ook naar de kathode gaat is afhankelijk van de plantesoort.

Höfner (1968) vindt dat Zn en Co in het xyleemexudaat van zonnebloem in gebonden vorm vervoerd worden en denkt daarbij aan aminozuren en peptide achtige verbindingen met een molecuulgewicht tussen ca 1500-5000. Bij gelfiltratie van xyleemexudaat op Sephadex G15⁻ vertoont de fractie die even snel als Blue Dextran 2000 geëluëerd wordt wel enige u.v. activiteit maar geen radioactiviteit, zodat binding aan eiwitten niet waarschijnlijk is. Binding van Zn en Co aan aminozuren ligt het meest voor de hand, ook gezien eerdere proeven, maar een eventuele binding aan koolhydraten kan niet worden uitgesloten (de fracties reageren positief op anthron). Voor Fe en Mn zijn later soortgelijke resultaten gevonden (Höfner, 1970).

In vorig onderzoek met floëemexudaat van *Ricinus communis* hebben we (Van Goor en Wiersma, 1976) gevonden dat Mn in het exudaat grotendeels als ion voorkomt en de rest gebonden is aan een complex met een molecuulgewicht van ca 1000 tot 5000. Zn komt voor in een negatief geladen verbinding met een molecuulgewicht tussen 1000 en 1500.

In het hier beschreven onderzoek wordt getracht de bindingsvorm van Ni en Co in het floëemexudaat van *Ricinus communis* vast te stellen. In het floëemexudaat van bomen is vitamine B₁₂ aangetroffen, Co kan dus in vitamine B₁₂ gebonden voorkomen. (Ziegler en Ziegler, 1962).

MATERIALEN EN METHODEN

De experimenten zijn uitgevoerd met floëemexudaat van *Ricinus communis* L. var. *gibsonii*. De omstandigheden tijdens de opkweek en het tappen waren gelijk aan die bij vroegere proeven (Van Goor en Wiersma, 1976). Aan de voedingsoplossing die $23,6 \times 10^{-3}$ mg Co/l of $17,4 \times 10^{-3}$ mg Ni/l bevat, is tijdens het tappen respectievelijk 1000 $\mu\text{Ci } ^{58}\text{CoCl}_2$ en 500 $\mu\text{Ci } ^{63}\text{NiCl}_2$, per pot van 5 l toegevoegd. Het floëemexudaat is verkregen door insnijdingen in de schors van de stengel volgens de methode van Milburn (1971). Er zijn drie planten opgekweekt op een oplossing met ^{63}Ni en vier planten op een oplossing met ^{58}Co .

De gelfiltratie met Sephadex G10 en G25 medium en de papierelectroforese zijn uitgevoerd volgens eerder beschreven methoden (Van Goor en Wiersma, 1976). Voor het bepalen van het void volume (het volume van de kolom buiten de Sephadex deeltjes) is gebruik gemaakt van Blue Dextran 2000 (molecuulgewicht 2.000.000) in een concentratie van 2 mg/ml. Als buffer is gebruikt Tris-HCl buffer met een pH van 8,2, omdat het floëemexudaat ook deze pH heeft en bij Co ook een natriumacetaat-azijnzuur buffer met pH 6,0. De buffers worden gemaakt door te mengen 500 ml 0,2 M Tris (hydroxymethyl) aminomethaan, 250 ml 0,2 M HCl en 250 ml water of 960 ml 0,2 M natriumacetaat en 40 ml 0,2 M azijnzuur.

Als referentieoplossing voor Ni is gebruikt een oplossing die 0,035 ppm Ni en 20 $\mu\text{Ci } ^{63}\text{Ni}/100$ ml. De referentieoplossing voor de Co proeven wordt op de volgende manier gemaakt:

de ontvangen 5 mCi "carrier-free" ^{58}Co in ca 0,2 ml 0,1 M HCl is verdund met 5 ml $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ oplossing (40 ppm Co in 0,1 M HCl). na tenminste 1 dag uitgewisseld te hebben is 0,1 ml hiervan verdund met 4 ml $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ oplossing (0,01 ppm Co in 0,005 M HCl) en in de koelkast gezet.

Als referentieoplossing voor de experimenten wordt genomen 2 ml $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ oplossing (0,01 ppm Co in 0,05 M of 0,005 M HCl) + 40 μl van de 2 maal verdunde ^{58}Co oplossing.

Er is steeds HCl toegevoegd omdat na het invoeren van een bereiding in duidelijk zuur milieu, geen onverklaarbare grote verbindingen in de referentieoplossing zijn aangetroffen.

De β -activiteit van het ^{63}Ni is gemeten met een Philips liquid scintillation counter PW4510 en de γ -activiteit van ^{59}Co met de Philips gamma counter PW4520. De fracties uit de Sephadex G10 kolom zijn ook onderzocht op kleurvorming met ninhydrine.

Een monster uit een fractie wordt 1:1 verdund met natriumacetaat-azijnzuur buffer met pH 4,4 en vervolgens wordt één deel ninhydrineoplossing volgens Höfner (1969) toegevoegd aan vier delen verdund monster. Nadat de reageerbuizen 20 minuten in zand van 105°C gestaan hebben, worden ze snel afgekoeld en de extinctie van de vloeistof bij 570 nm bepaald met een Zeiss spectrofotometer PMQ II.

RESULTATEN EN DISCUSSIE

Bij de gelfiltratie met behulp van Sephadex G10 en G25 is er een heel duidelijk verschil tussen het Ni uit het floëemexudaat en het Ni van de referentieoplossingen (figuren 1 en 2); hieruit volgt dat het Ni in het floëemexudaat gebonden voorkomt. Het Ni complex in het exudaat ligt qua molecuulgrootte niet in het fractioneringsgebied van Sephadex G10 (molecuulgewichten van 0 tot ca 700), wel in dat van Sephadex G25 (molecuulgewichten van ca 1000 tot ca 5000). Uit de resultaten van de papierelectroforese blijkt dat het Ni-complex in het exudaat negatief geladen is (figuur 3). Het Ni wordt dus in het floëem vervoerd aan een negatief geladen verbindingen met een molecuulgewicht tussen 1000 en 5000.

Gelfiltratie van floëemexudaat met gemerkt Co en een referentieoplossing van Co^{2+} met ^{59}Co , laat bij Sephadex G10 en G25 duidelijk te zien dat ook Co in het floëemexudaat gebonden voorkomt (figuren 4 en 5). De verbindingen waaraan het Co gebonden is, liggen in het fractioneringsgebied van Sephadex G25 en heeft dus een molecuulgewicht tussen 1000 en 5000. Papierelectroforese geeft te zien dat het Co van de referentieoplossing iets naar de kathode gaat en het Co van het floëemexudaat voor een groot deel naar de anode (figuur 6). Het Co in het floëemexudaat komt dus vóór in verbindingen met een molecuulgewicht tussen 1000 en 5000, die grotendeels negatief geladen zijn. De zuurgraad van de referentie oplossing, resp. 0,05 M, 0,005 M en geen HCl, heeft in dit pH-gebied geen invloed op de resultaten.

Het onderzoek ondervond bij Co in het begin erg veel moeilijkheden doordat de referentie zich afwijkend gedroeg. Het ^{59}Co van de referentieoplossing kwam uit de Sephadex G10 kolom in verbindingen met een molecuulgewicht > 700 (figuur 7) en volgens de papierelectroforese waren deze verbindingen voor verreweg het grootste deel negatief geladen, de rest was ongeladen (figuur 8). Omdat dit een onverwacht gedrag is voor een Co-ion, is onderzoek gedaan naar het gedrag van Co ten opzichte van buffer, pH enz. (zie bijlagen).

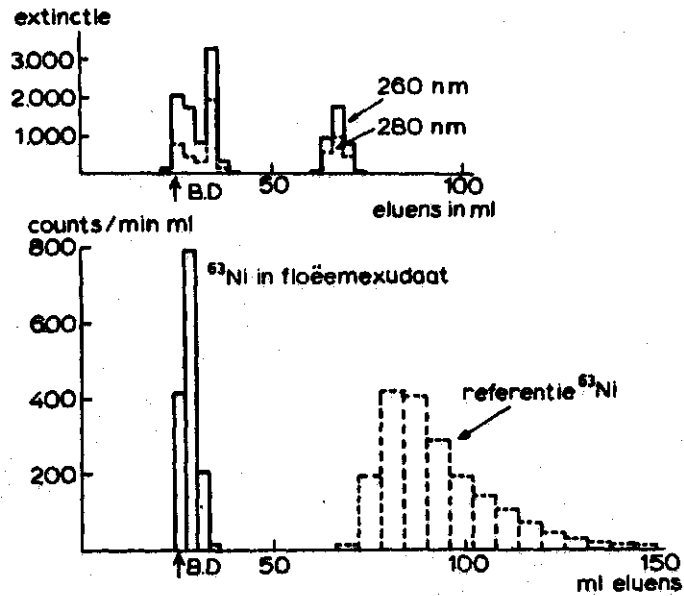


Fig. 1. Gelfiltratie van floëemexudaat door een Sephadex G10 kolom. Het elutiemiddel is Tris-HCl buffer met pH 8,2. ↑ B.D.=Blue Dextran 2000.

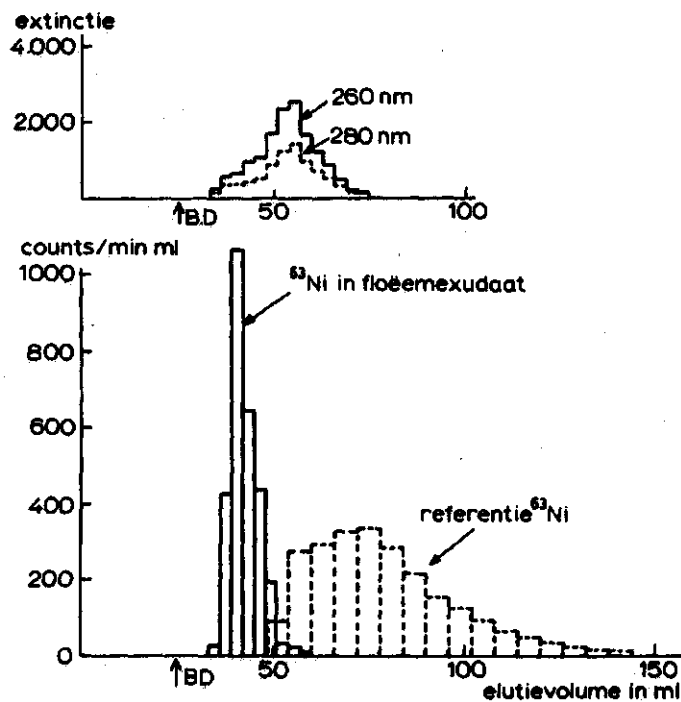


Fig. 2. Gelfiltratie van floëemexudaat door een Sephadex G25 medium kolom. Het elutiemiddel is Tris-HCl buffer met pH 8,2. ↑ B.D.=Blue Dextran 2000.

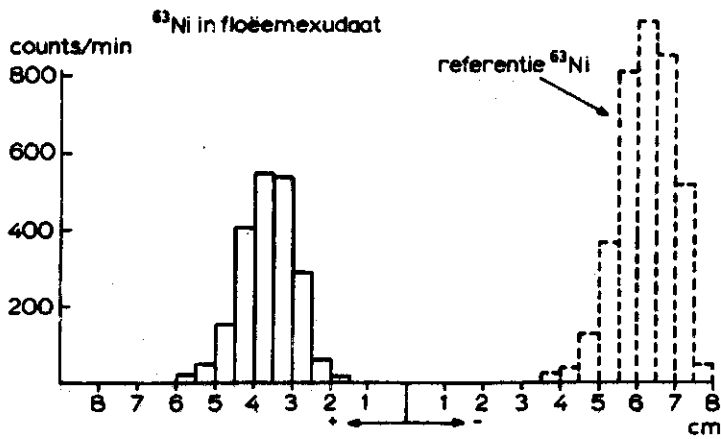


Fig. 3. Papierelectroforese van floëmexudaat in een medium van Tris-HCl buffer met pH 8,2.

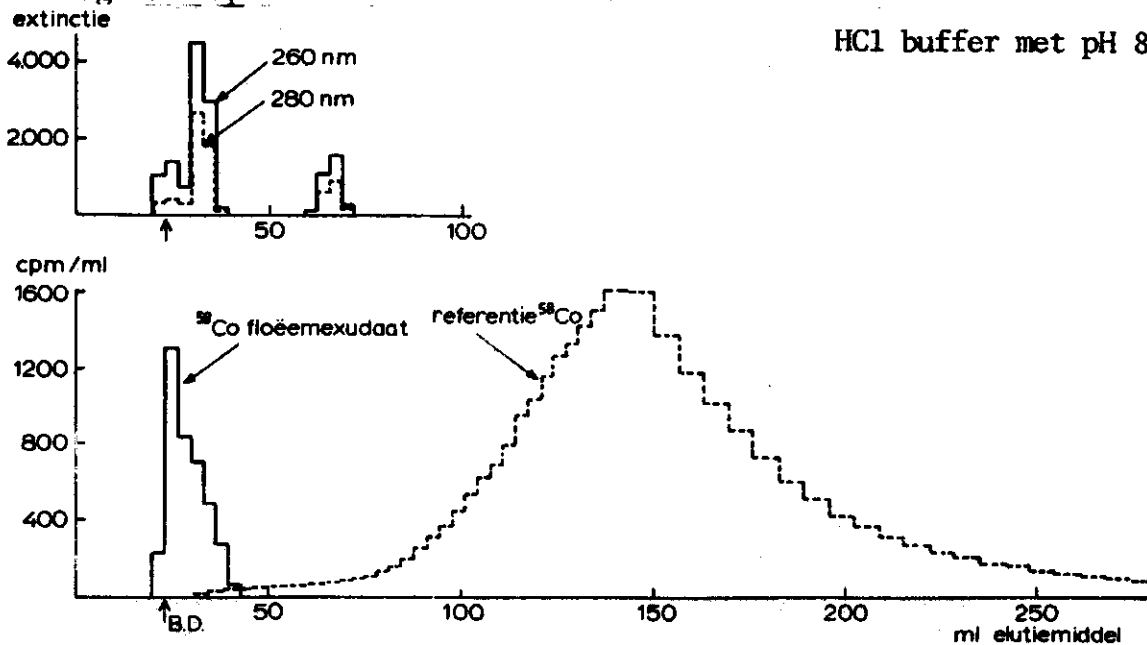


Fig. 4. Gelfiltratie van floëmexudaat door een Sephadex G10 kolom. Het elutiemiddel is Tris-HCl buffer met pH 8,2. ↑ B.D.=Blue Dextran 2000.

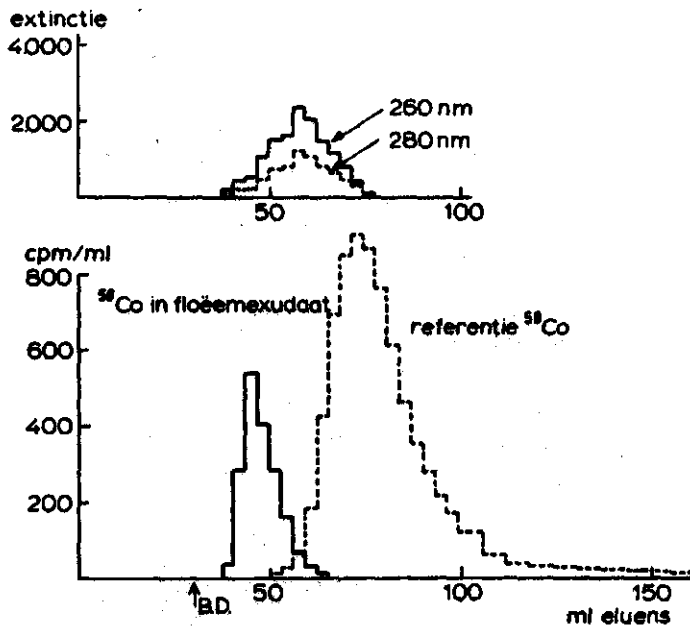


Fig. 5. Gelfiltratie van floemexudaat door een Sephadex G25 medium kolom. Het elutiemiddel is Tris-HCl buffer met pH 8,2. \uparrow B.D.=Blue Dextran 2000.

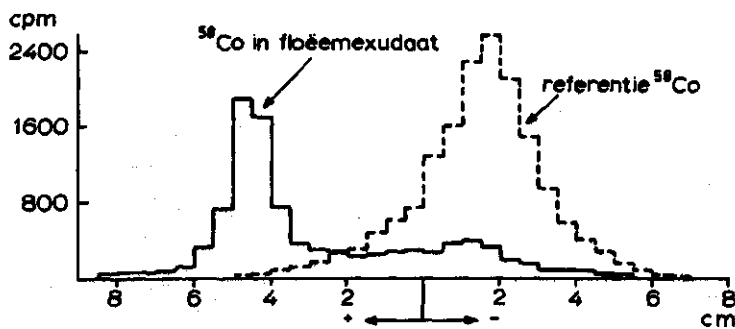


Fig. 6. Papierelectroforese van floemexudaat in een medium van Tris-HCl buffer met pH 8.2.

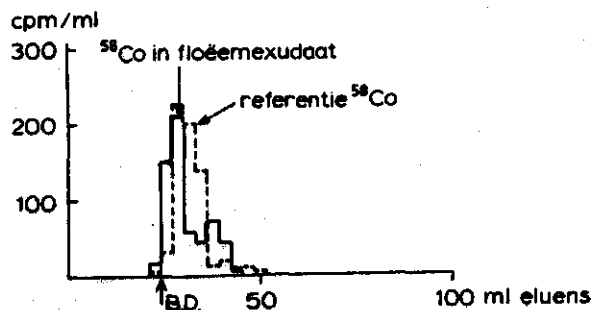


Fig. 7. Gelfiltratie van floëemexudaat met een Sephadex G10 kolom. Dit is het resultaat van één van de eerste keren, met een referentie die bestaat uit een $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ opl. met 0,15 ppm Co + verdunde $^{58}\text{CoCl}_2$ opl. Tris-HCl pH 8,2 als elutiemiddel. \uparrow B.D.=Blue Dextran 2000.

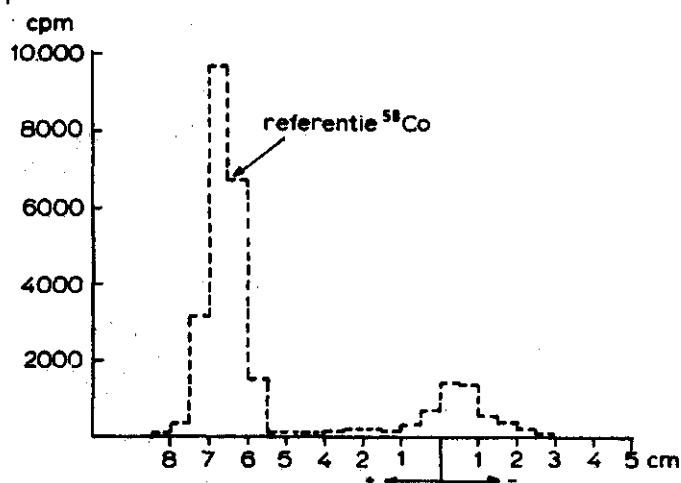


Fig. 8. Het eerste resultaat van papierelectroforese van een $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ opl. met 0,15 ppm Co + verdunde $^{58}\text{CoCl}_2$ opl. Tris-HCl pH 8,2 als elutiemiddel.

Wat er in dit geval precies met het Co^{2+} van de referentie gebeurt is niet duidelijk. Een kleine hoeveelheid Co^{2+} in Tris-HCl buffer met pH 8,2 geeft al gauw een groenige kleur, maar de papierelectroforese, laat bij het begin van de experimenten veel negatief geladen ^{58}Co zien. Behalve het vormen van een Co-Tris complex moet er dus ook nog iets anders gebeuren. Volgens de literatuur is een 1:1 complex van Co^{2+} met Tris bij pH 8,2 wel te verwachten. (Hanlon et al, 1966), de vorming van polymere vormen van Co-hydroxide is echter erg onwaarschijnlijk vanwege de lage concentratie Co in de referentieoplossing (Baes en Mesmer, 1976). De vrij snelle kleurverandering van $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ in Tris-HCl buffer met pH 8,2 van rose tot donker groen zou er ook op kunnen wijzen dat Co^{2+} geoxideerd wordt tot Co^{3+} onder vorming van een Co^{3+} -Tris complex (zie bijlage 2). Een verklaring voor de "grote" verbindingen waarin het ^{58}Co bij de gelfiltratie voorkomt is niet te geven. Nadat het Co gehalte van de referentieoplossing teruggebracht is van 0,15 naar 0,01 ppm en er voor gezorgd is dat de $^{58}\text{Co}^{2+}$ voorraad onder alle omstandigheden in een duidelijk zuur milieu blijft, is er bij herhaling een duidelijk verschil gevonden tussen Co uit het floëemexudaat en de referentieoplossing. Het Co gehalte van de referentieoplossing is verlaagd van 0,15 tot 0,01 ppm, omdat tijdens de experimenten analyse van het floëemexudaat aantoonde dat het Co gehalte in de buurt van de 0,01 ppm ligt.

Om de invloed van een Co-Tris interactie op de resultaten te vermijden, zijn de experimenten ook uitgevoerd in Na acetaat-azijnzuur buffer met pH 6,0. De papierelectroforese maakt in dit geval weinig duidelijk omdat het Co uit het floëemexudaat en de referentieoplossing vrijwel op de opbrengplaats blijven (figuur 9). Gelfiltratie met Sephadex G10 laat enig verschil zien (figuur 10) maar bij Sephadex G25 is er geen verschil. Deze experimenten zijn in enkelvoud uitgevoerd, zodat de resultaten wat minder betrouwbaar zijn. De resultaten met Na acetaat-azijnzuur buffer met pH 6,0 laten zich heel moeilijk plaatsen tussen die van de proeven die zijn uitgevoerd met Tris-HCl buffer. Bij de papierelectroforese zou het zich niet verplaatsen van het ^{58}Co uit het floëemexudaat kunnen betekenen dat het hier om een ander complex gaat dan bij de Tris-HCl buffer, of dat de lading van het complex afhankelijk is van de pH.

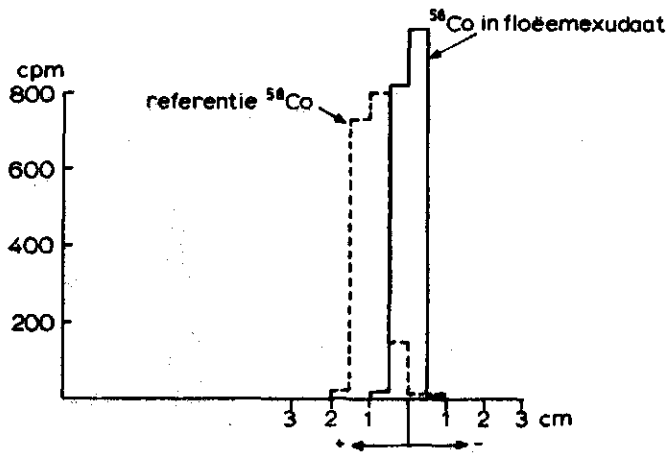


Fig. 9. Papirelectroforese van floëemexudaat met een medium van Na acetaat-azijnzuur met pH 6,0.

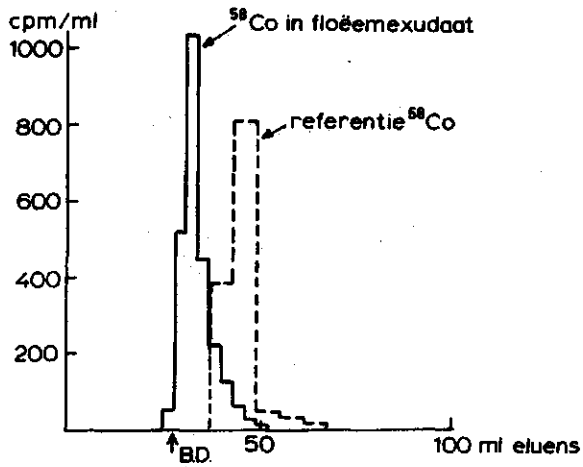


Fig. 10. Gelfiltratie van floëemexudaat met een Sephadex G10 kolom Na acetaat-azijnzuur pH 6,0 als elutiemiddel. ↑ B.D.=Blue Dextran 2000.

Tenslotte de resultaten van de u.v. absorptie en de ninhydrinekleuring van de fracties. De fracties waarin Ni en Co uit het floëemexudaat uit de kolom komen, geven u.v. absorptie bij 260 en 280 nm en reageren ninhydrine positief (figuur 11). De verhouding tussen de absorptie bij 260 nm tot die bij 280 nm is bij de Ni of Co radioactiviteitspiek ca 3,2, terwijl deze voor zuivere nucleotiden ongeveer 2 is. De metalen kunnen dus gebonden zijn aan polypeptiden en/of polynucleotiden. Om een betere indruk te krijgen van de metaalbindende verbindingen in de metaalbindende fracties, is het nodig deze verder fysisch-chemisch te scheiden omdat ze nu waarschijnlijk nog een mengsel van verbindingen bevatten. Men zou dan ook nog kunnen proberen Co als vitamine B₁₂ aan te tonen, deze vitamine is in floëemexudaat van enige bomen in zeer lage concentratie geworden (Ziegler und Ziegler, 1962).

Samenvattend kan men zeggen dat Ni en Co in het floëemsap van Ricinus voorkomen in waarschijnlijk polypeptide en/of polynucleotide verbindingen met een molecuulgewicht tussen 1000 en 5000. In de resultaten van de proeven met Co blijft enige onzekerheid door het onverklaarbare gedrag van de Co-zouten in bepaalde gevallen en onder bepaalde omstandigheden.

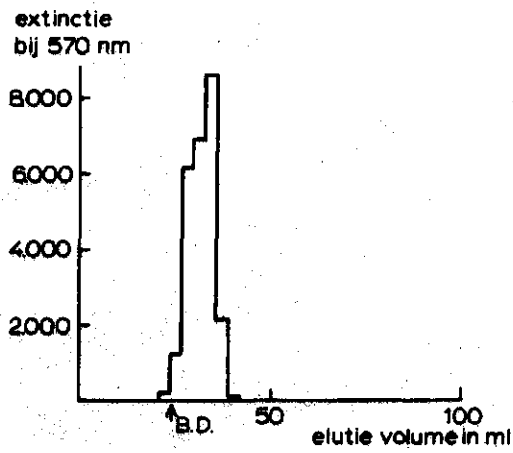


Fig. 11. Gelfiltratie van floëemexudaat door een Sephadex G10 kolom. Het elutie-middel is Tris-HCl buffer met pH 8,2. De ninhydrinekleuring is gemeten bij 570 nm. ↑ B.D.=Blue Detran 2000.

SAMENVATTING

Er is gezocht naar de chemische vorm waarin Ni en Co in de zeefvaten ver-
voerd worden. Het floëmsap is verkregen door insnijdingen in de schors
van de stengel van *Ricinus communis*-planten en het exudaat op te vangen
met een capilair. De metalen zijn als ^{63}Ni en ^{58}Co toegediend aan de
voedingsoplossing. De componenten van het sap zijn gescheiden op mole-
cuulgewicht met Sephadex kolommen en op lading met papierelectroforese.
Het ^{63}Ni en het ^{58}Co blijken aan verbindingen met een molecuulgewicht
tussen 1000 en 5000 gebonden te zijn. ^{63}Ni blijkt aan negatief geladen
en ^{58}Co grotendeels aan negatief geladen verbindingen, waarschijnlijk
polypeptiden en/of polynucleotiden, voor te komen.

LITERATUUR

- Baes, C.F. and Mesmer, R.E., 1976. The hydrolysis of cations. John Wiley, New York.
- Goor, B.J. van and Wiersma, D., 1976. Chemical forms of manganese and zinc in phloem exudates. *Physiol. Plant.* 36: 213-216.
- Hanlon, D.P., Watt, D.S. and Westhead, E.W., 1966. The interaction of divalent metal ions with Tris-HCl buffer in dilute solution. *Anal. Biochem.* 16: 225-233.
- Höfner, W., 1969. Nachweis und Trennung organischer Verbindungen des Zinks und des Kobalts im Exudat von *Helianthus annuus* durch Gelfiltration an Sephadex. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* 123: 11-21.
- Höfner, W., 1970. Eisen- und manganhaltige Verbindungen im Blutungssaft von *Helianthus annuus*. *Physiol. Plant.* 23: 673-677.
- Milburn, J.A., 1971. An analysis of the response in phloem exudation on application of massage to *Ricinus*. *Planta (Berl)* 100: 143-154.
- Schweitzer, G.K. and Willis, W.v., 1966. The solvent extraction of metal chelates. In: *Advances in analytical chemistry and instrumentation*. Interscience Publishers, New York.
- Tiffin, L.O., 1967. Translocation of manganese, iron, cobalt and zinc in tomato. *Plant Physiol.* 42: 1427-1432.
- Tiffin, L.O., 1971. Translocation of nickel in xylem exudate in plants. *Plant Physiol.* 48: 273-277.
- Tiffin, L.O., 1972. Translocation of micronutrients in plants. In: *Micronutrients in agriculture*, Ed. J.J. Mortvedt, P.M. Giordano and W.L. Lindsay. Soil Sci. Soc. Am., Madison, U.S.A.
- Ziegler, H. und Ziegler, I., 1962. Die wasserlöslichen Vitamine in den Siebröhrensäften einiger Bäume. *Flora (Jena)* 152: 257-278.

BIJLAGE 1

Literatuurgegevens over Co zouten wat betreft oplosbaarheid, hydrolyse, oxidatie en reductie enz.

In zuiver water is alleen Co^{2+} stabiel, Co^{3+} oxideert H_2O en gaat weer over in Co^{2+} (Baes et al, 1976) Co^{3+} kan sterk gestabiliseerd worden door complexvorming (speciaal N donors b.v. NH_3 , amines als nitrogroepen, ethyleendiamine) Hydrolyse van Co^{2+} kan bij lage concentratie en niet te hoge pH, CoOH^+ en Co(OH)_2 geven. De oplosbaarheid van Co(OH)_2 is 0,00032 g per 100 ml, $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$ en $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zijn niet oplosbaar, $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ is iets oplosbaar.

Bij pH 8,2 is het grootste deel van het Co (II) aanwezig als Co(OH)^+ , Co (III) is nog sterker gehydrolyseerd want bij pH 1,8 komt de helft van het Co(III) als Co(OH)^{2+} voor (Schweitzer et al., 1966).

Voor de rest is van de hydrolyse van Co^{3+} weinig bekend.

In aanwezigheid van Tris (hydroxymethyl) aminomethaan bij pH 8,2 behoort een 1:1 complex met Co (II) tot de mogelijkheden (Hanlon et al., 1966).

BIJLAGE 2

Oxidatie van het Co^{2+} ion door luchtzuurstof

Halfreactie: $\text{Co}^{2+} \rightleftharpoons \text{Co}^{3+} + e$

$$E_{\text{Co}} = E_{\text{O}}(\text{Co}) + 0,059 \log \frac{(\text{Co}^{3+})}{(\text{Co}^{2+})} \quad E_{\text{O}}(\text{Co}) = 1,82\text{V}$$

Halfreactie: $\text{O}_2 + 4\text{H}_3\text{O}^+ + 4e \rightleftharpoons 6\text{H}_2\text{O}$

$$E_{\text{O}_2} = E_{\text{O}}(\text{O}_2) + \frac{0,059}{4} \log (\text{H}_3\text{O}^+)^4 p_{\text{O}_2} \quad E_{\text{O}}(\text{O}_2) = 1,23\text{V}$$

Totaal-

reactie : $4\text{Co}^{2+} + \text{O}_2 + 4\text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons 4\text{Co}^{3+} + 6\text{H}_2\text{O}$

$$K = \frac{[\text{Co}^{3+}]^4}{[\text{Co}^{2+}]^4} \frac{1}{p_{\text{O}_2} (\text{H}_3\text{O}^+)^4} \Rightarrow K = f(\text{pH})$$

Bij evenwicht moet gelden : $E_{\text{Co}} = E_{\text{O}_2}$

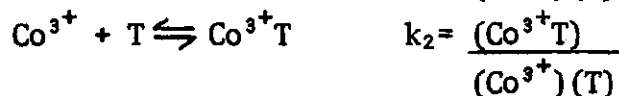
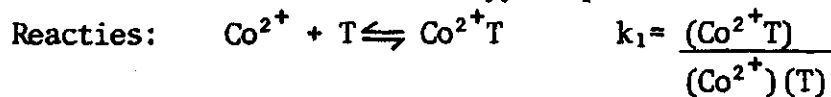
$$E_{\text{O}}(\text{Co}) + 0,059 \log \frac{(\text{Co}^{3+})}{(\text{Co}^{2+})} = E_{\text{O}}(\text{O}_2) + \frac{0,059}{4} \log (\text{H}_3\text{O}^+)^4 p_{\text{O}_2}$$

$$-E_{\text{O}}(\text{Co}) + E_{\text{O}}(\text{O}_2) = \frac{0,059}{4} \log \left[\frac{(\text{Co}^{3+})}{(\text{Co}^{2+})} \right]^4 \frac{1}{(\text{H}_3\text{O}^+)^4 p_{\text{O}_2}}$$

$$K = \frac{[\text{Co}^{3+}]^4}{[\text{Co}^{2+}]^4} \frac{1}{(\text{H}_3\text{O}^+)^4 p_{\text{O}_2}} = 10^{-40}$$

Normaal verloopt de oxidatie niet, maar behalve de pH is er nog een factor die invloed heeft op het al of niet verlopen van de reactie, namelijk het verschil in grootte tussen de complexvormingskonstanten van Co^{2+} -Tris en Co^{3+} -Tris.

De invloed van de Tris-HCl buffer op de stabiliteit van het Co^{2+} ion



$$E_{\text{Co}} = E_{\text{O}}(\text{Co}) + 0,059 \log \frac{(\text{Co}^{3+})}{(\text{Co}^{2+})}$$

$$E_{\text{Co}} = E_{\text{O}}(\text{Co}) + 0,059 \log \frac{(\text{Co}^{3+}\text{T})}{k_2 (\text{T})} \frac{k_1 (\text{T})}{(\text{Co}^{2+}\text{T})}$$

$$E_{\text{Co}} = E_{\text{O}}(\text{Co}) + 0,059 \log \frac{k_1}{k_2} + 0,059 \log \frac{(\text{Co}^{3+}\text{T})}{(\text{Co}^{2+}\text{T})}$$

$$E_{\text{Co}} = E^1(\text{Co}) + 0,059 \log \frac{(\text{Co}^{3+}\text{T})}{(\text{Co}^{2+}\text{T})}$$

Als k_2 voldoende groot is dan k_1 , dan wordt $E^1(\text{Co})$ kleiner dan $E_{\text{O}}(\text{Co})$.
 Als k_2 veel groter is, dan wordt $E^1(\text{Co})$ kleiner dan $E_{\text{O}}(\text{O}_2)$ en verloopt de oxidatie van Co^{2+} naar Co^{3+} . Waarschijnlijk is het verschil in grootte tussen de complexvormingsconstanten van Co^{2+} -Tris en Co^{3+} -Tris vrij groot, de complexvormingsconstante van Co^{3+} -Tris is niet bekend maar het is wel bekend dat Co^{3+} sterke complexen geeft met N donors en dus ook met Tris.