

Analytik niedermolekularer Metall-Liganden-Komplexe

–

Gleichgewichte in Pflanzen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von der
staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin Jessica Köster

aus

Datteln

Tag der mündlichen Prüfung: 04. November 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Albert Sickmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Nicolaus von Wirén

Dortmund 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	23
1.1	Bedeutung von Metallen in der Pflanzenernährung	23
1.2	Eisenaufnahmewege der Pflanzen	24
1.3	Analytik von Metallspezies in Pflanzen	28
2	Ziel der Arbeit	31
3	Biologische Grundlagen	33
3.1	Faktoren in der Metallhomöostase von Pflanzen	33
3.1.1	Metalltransporter	34
3.1.2	Phytosiderophore als Liganden für den Metalltransport	36
3.1.3	Andere Liganden für den Metalltransport	36
3.2	Biologische Versuchsplanung	39
4	Methodische Grundlagen	44
4.1	Elektrophoretische Trennverfahren	45
4.1.1	Trennung von Metallspezies mit IEF	47
4.1.2	Trennung von Metallspezies mit Kapillarelektrophorese (CE)	50
4.2	Speziesanalyse: Chromatographische Trennung von Metallspezies, geeignete Trennprinzipien	52
4.3	Speziesanalyse: Identifizierung labiler Metallspezies	55
4.3.1	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)	55
4.3.2	Massenspektrometrische Detektion	57
4.4	Stand der Technik Speziesanalyse in Pflanzen	58
4.4.1	IEF für Metalle bzw. Metallspezies	58
4.4.2	Speziesanalyse in Pflanzen	59
4.5	Softwaregestützte Non-targeted Analyse	61
5	Experimentelles	63
5.1	Material	63
5.1.1	Chemikalien	63
5.1.2	Geräte	64
5.2	Methoden	66
5.2.1	Biologische Proben	66
5.2.2	Trennung mit IEF	67

5.2.3	Identifizierung von Metallspezies (Direktinfusionsexperimente)	70
5.2.4	Chromatographische Trennung von Metallspezies	71
5.2.5	Kapillarelektrophoretische Trennung	75
5.2.6	Auswertung der Rohdaten	76
6	Ergebnisse und Diskussion	78
6.1	Trennung von Metallspezies mit IEF	78
6.1.1	Stabilität und Fokussierbarkeit von Metallkomplexen	80
6.1.2	Fokussierung von DMA und Fe(III)-DMA	89
6.1.3	Kopplung von IEF mit einer HPLC-Trennung	93
6.1.4	Kapillar-IEF von Metallkomplexen	95
6.1.5	CE von Metallspezies	99
6.2	Trennung und Identifizierung von labilen Metallspezies	101
6.2.1	Voraussetzungen zur Analyse von Metallspezies	102
6.2.2	Evaluierung geeigneter Säulenmaterialien	103
6.2.3	Identifizierung von biologisch interessanten Metallkomplexen	117
6.2.4	Trennung von labilen Metallkomplexen in Modellmischungen	138
6.2.5	Anwendbarkeit der Trennmethode in biologischen Matrices	154
6.3	Untersuchung von Metallspezies-Gleichgewichten in Pflanzen	165
6.3.1	Voraussetzungen für die Beantwortung biologischer Fragestellungen	166
6.3.2	Metallkomplexe	168
6.3.3	Identifizierung von bisher unbekanntem Metaboliten zur Unterscheidung der Ernährungszustände	178
7	Zusammenfassung und Ausblick	199
8	Literatur	203
9	Anhang	217
9.1	Metabolite des Citratzyklus	217
9.2	Aminosäuren	220
9.3	PCA-Analysen des Massenbereichs 65-175 m/z	227
9.4	PCA-Analysen des Massenbereichs 450-1000	229

Jessica Köster

Persönliche Angaben

Geboren	am 07.02.1981 in Datteln
Familienstand	ledig, keine Kinder
Nationalität	deutsch
Adresse	Düsseldorfer Straße 45, 44143 Dortmund

Studium und Berufsausbildung

06/2008 - heute	<p>Promotionsstudium im Projektbereich Systemanalyse am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS, Dortmund</p> <p>Thema: „Entwicklung von Verfahren zur Analytik niedermolekularer Metall-Liganden-Komplexe – Gleichgewichte in Pflanzen“</p>
10/2006-09/2007	<p>Praktisches Jahr für Lebensmittelchemiker bei</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Lebensmittel-Labor Dr. Weßling GmbH▪ Amt für Lebensmittelüberwachung des Kreises Steinfurt▪ Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster <p><i>Staatsprüfung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin, Note: gut (1,9)</i></p>
10/2000-04/2006	<p>Studium der Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, wissenschaftliche Forschungsarbeit</p> <p>Thema: „Quantitative Bestimmung und sensorische Charakterisierung von glutaminsäurehaltigen Dipeptiden“</p> <p><i>Abschluss: Erstes Staatsexamen, Note: gut (1,6)</i></p>

Berufliche Erfahrungen

- 01/2013-03/2013 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** im Projektbereich Systemanalyse am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS in Dortmund
- 04/2008-06/2011 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** im Projektbereich Metabolomics am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS in Dortmund

Schulbildung

- 08/1987-06/2000 Grundschule und Gymnasium in Datteln
- Abschluss: allgemeine Hochschulreife, Note: gut (2,5)*

Im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichte Publikationen

Shi, R.; Weber, G.; **Köster, J.**; Reza-Hajirezaei, M.; Zou, C.; Zhang, F.; von Wiren, N.; *Senescence-induced iron mobilization in source leaves of barley (*Hordeum vulgare*) plants*; *New Phytol.* 2012, 195, 372-383

Köster, J.; Hayen, H.; von Wiren, N.; Weber, G.; *Isoelectric Focussing of small non covalent metal species from plants*; *Electrophoresis*; 2011, 32, 772-781

Köster, J.; Shi, R.; von Wiren, N.; Weber, G.; *Evaluation of different column types for the hydrophilic interaction chromatographic separation of iron-citrate and copper histidine species from plants*; *J. Chromatogr. A*; 2011, 1218, 4934-4943

A.M.S.EI-Preis 2011

Anlässlich der Anakon 2011 in Zürich verliehener A.M.S.EI-Preis für die Veröffentlichung: "Isoelectric Focussing of small non covalent metal species from plants"

1. Posterpreis

anlässlich der Anakon 2009, „Mehrdimensionale Trennung von Metallspezies in Pflanzenproben“

Vorträge

Köster, J.; Hayen, H.; Weber, G.; “*Development of methods for the analysis of low molecular weight metal complexes and their equilibria in plants*”, Doktorandenseminar des Arbeitskreis Separation Science 2010 in Hohenroda

Köster, J.; Weber, G.; “*Analysis of labile metal complexes in plants by HILIC-ESI/MS*”, ISC 2010 in Valencia

Köster, J.; Weber, G.; “*Isoelektrische Fokussierung kleiner, nicht kovalenter Metallspezies in Pflanzen*”, Anakon 2011 in Zürich

Posterpräsentationen

Köster, J.; Weber, G.; “*Isoelectric focussing of EDDHA and respective metalspecies*”, ISC 2008 in Münster

Köster, J.; Hayen, H.; Weber, G.; “*Mehrdimensionale Trennung von Metallspezies in Pflanzenproben*” (1. Platz: Poster), Anakon 2009 in Berlin

Köster, J.; Hayen, H.; Weber, G.; “*Speciation of metal–citrate complexes in plant samples by HILIC-ESI/MS*”, HPLC 2009 in Dresden

Köster, J.; Weber, G.; Poster: “*Separation of iron citrate complexes from plants by HILIC-ESI/MS*”, DGMS 2011 in Dortmund

Symbole und Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
epi-HMA	3-epi-Hydroxymugineinsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
FRO	Iron-Regulated Ferric Chelate Reductase
FTICR	Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonanz
GSH	Glutathion (reduziert)
HEC	Hydroxyethylcellulose
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HMA	3-Hydroxymugineinsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IET	Isoelectric Trapping
IRT	Iron-Regulated Transporter
KE	Kollisionsenergie
LC	Flüssigchromatographie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MA	Mugineinsäure
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NA	Nicotianamin
NAAT	Nicotianaminaminotransferase
NAS	Nicotianaminsynthase
NP	Normalphase
OL	Ältestes Blatt
PCA	Hauptkomponentenanalyse
pI	Isoelektrischer Punkt
PS	Phytosiderophor
RP	Umkehrphase

Symbole und Abkürzungen

SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
SOL	Zweitältestes Blatt
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbares Licht
YSL	Yellow-stripe-like

Symbol	Bedeutung
---------------	------------------

μ	Mobilität
d	Durchmesser
e	Elementarladung
E	Elektrisches Feld
F	Kraft
f	Reibungskraft
I	Stromstärke
η	Viskosität
R	Radius
U	Spannung
v	Geschwindigkeit
z	Anzahl der Elementarladungen
K	Leitfähigkeit

- Abbildung 1: Biosynthese von Phytosiderophoren (PS) **25**
- Abbildung 2: Modell der Aufnahme und des Transportes von Eisen in Pflanzen mit Schwerpunkt auf dem Wechsel der Eisenbindungsformen (aus Blankenburg, von Wirén, Gülke, Weiss & Bullen 2009, Elements 5, 375-380) **27**
- Abbildung 3: Analytische Probleme für nicht kovalente Metallspezies (Bsp. Eisen) **30**
- Abbildung 4: Aufbau von Experiment 2: Die Wurzeln der 5 Tage alten Pflanzen wurden in zwei Hälften geteilt und getrennt mit Nährstoffen versorgt („split-root-System“). Nach 9 Tagen wurden die eisenaufnehmenden Wurzelhälften (bzw. eine der eisenaufnehmenden Hälften) gekappt (-Fe, +Fe). Nach 13 Tagen erfolgte die erste Ernte, bei den restlichen Pflanzen wurde jeweils in der Hälfte der Gruppe Seneszenz durch Stickstoffmangel ausgelöst (-Fe-N, -N). Die zweite Hälfte diente als Kontrollgruppe (-Fe, CK). 8 Tage später erfolgte die zweite Ernte. Dabei wurden jeweils die einzelnen Pflanzenteile getrennt geerntet (untersucht wurden ältestes Blatt OL, zweitältestes Blatt SOL). **40**
- Abbildung 5: Aufbau von Experiment 3: Die Wurzeln der 5 Tage alten Pflanzen wurden in zwei Hälften geteilt und getrennt mit Nährstoffen versorgt („split-root-System“). Nach 9 Tagen wurden die Eisen-führenden Wurzelhälften (bzw. eine der Eisen-führenden Hälften) gekappt (-Fe, +Fe). Nach 13 Tagen wurde jeweils bei der Hälfte der Gruppe das älteste Blatt beschattet und dadurch Seneszenz ausgelöst (- Fe+S, CK+S). Die zweite Hälfte diente als Kontrollgruppe (-Fe, CK). 7 Tage später erfolgte die Ernte. Dabei wurden jeweils die einzelnen Pflanzenteile getrennt geerntet (untersucht wurden ältestes Blatt OL, zweitältestes Blatt SOL). **41**
- Abbildung 6: Schematischer Aufbau bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) in wässriger Lösung, Anschluss der Trennkammer; Trennung von drei unterschiedlichen Analytmolekülen (gepunktet, kariert, schraffiert) **48**
- Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufes einer Fokussierung in wässriger Lösung; Trennung von drei unterschiedlichen Analytmolekülen (gepunktet, kariert, schraffiert) **49**
- Abbildung 8: Aufbau der C⁴D (capacitively coupled contactless conductivity detection); aus [68] **52**
- Abbildung 9: Beispiele für die Struktur kommerzieller HILIC-Phasen A) Amidphase (Amide-80, Tosoh); B) quervernetzte Diolphase (Luna-HILIC, Phenomenex); C) Sulfobetainphase (Zic-HILIC, Sequant) **54**

-
- Abbildung 10: Generierung von Ionen mit Elektrosprayionisation (ESI) [78] **57**
- Abbildung 11: Schematische Darstellung der Elution der durch semipräparative IEF getrennten Probe: die Kanülen werden simultan in den mit 20 Löchern versehenen und mit Klebefolie verschlossenen Probenzylinder eingestochen und die Lösung durch ein angelegtes Wasserstrahlvakuum eluiert. Die einzelnen Fraktionen werden in Probengläsern aufgefangen **68**
- Abbildung 12: Kalibrationsgerade für die AAS-Bestimmung von Eisen, Konzentrationsbereich 1-10 mg/l, Mittelwert aus drei Messungen, Bestimmtheitsmaß 0,9888 **69**
- Abbildung 13: Zwitterionische Struktur von Nicotianamin (NA) und pK-Werte [29] **79**
- Abbildung 14: Fokussierung eines 100 mg/l Kupferstandards (mit 2% Bio-Lyte 3-10, 12 W, 50 min); Mittelwert aus zwei Messungen **82**
- Abbildung 15: Fokussierung eines Standards mit 150 mg/L Kupfer und 1 g/L Histidin (mit 2% Bio Lyte 3-10, 12 W, 50 min); Mittelwert aus zwei Messungen **83**
- Abbildung 16: Fokussierung eines Kupfer-Glutathion-Standards (1:1) (—■— Cu (AAS)), im Vergleich mit freiem GSH (—▲— GSH (UV)) **84**
- Abbildung 17: Fokussierung von ——EDDHA (freier Ligand) und — 1:1 Fe(III)-EDDHA-Komplex; Detektion mit DAD (Fe(III)-EDDHA: 480 nm; EDDHA: 280 nm) **86**
- Abbildung 18: Fokussierung von A) EDDHA-Komplexen mit dreiwertigen Metallionen (▲ Ga-EDDHA ■ Fe-EDDHA ◇ Al-EDDHA) und B) EDDHA (▲) und EDDHA-Komplexen (◇ Zn-EDDHA ■ Ni-EDDHA) mit zweiwertigen Metallionen (Fe(III)-EDDHA: 480 nm; Andere: 280 nm) **87**
- Abbildung 19: Struktur und pK-Werte von DMA (Deoxymugineinsäure)[13] **91**
- Abbildung 20: Fokussierung einer DMA-haltigen Pflanzenprobe; ■ DMA, ▲ Fe(III)-DMA, ● Fe; Detektion mit Massenspektrometrie (DMA, Fe-(III)-DMA) bzw. AAS (Fe); Identifizierung über MS³ (Fe(III)-DMA: m/z = 356.0 → 312.0 → 268.0; DMA: m/z=303.1 → 285.1 → 183.0) **91**
- Abbildung 21: Fokussierung von Fe(III)-DMA in zwei Proben Xylemexsudat von Weizenpflanzen ■ Kontrollprobe mit Eisen ernährt ▲ Pflanze unter Eisenmangel aufgezogen; Detektion mit MS³ (Fe(III)-DMA: m/z = 356.0 → 312.0 → 268.0; DMA: m/z=303.1 → 285.1 → 183.0) **93**
- Abbildung 22: Kopplung der IEF-Vortrennung mit einer HILIC-Trennung und MS-Detektion A) TIC; B) DMA (m/z = 303,1); C) Fe(III)-DMA (m/z = 356,03); a)

Carrier-Ampholyte	94
Abbildung 23: cIEF von A) eisenhaltigen Proteinen als bekannte pI-Standards und B) Fe(III)-EDDHA; a) Cytochrom (pI 9,1), b) Myoglobin Isoform I (pI 7,2), c) Myoglobin Isoform II (pI 6,8), d) Signal stammt wahrscheinlich aus einer Verunreinigung des EDDHA, e) Fe(III)-EDDHA	96
Abbildung 24: cIEF von A) Fe(III)-EDDHA; B) Ga-EDDHA in 1 % Pharma Lyte 2,5-5,0 mit 0,2 % HEC und 0,5 % TEMED; Fokussierung 10 min bei 15 kV; hydrodynamische Mobilisierung mit 40 mbar und 15 kV; UV-Detektion bei 280 nm; zwei pI-Standards a) β -Lactoglobulin pI 5,1, d) Amyloglycosidase pI 3,6; f) Fe-EDDHA/Ga-EDDHA (pI 2,6; e) Blindwert der CA; b)+c) Signale wahrscheinlich durch Interaktion der Komplexe mit den Proteinstandards	98
Abbildung 25: CE von Metall-EDDHA-Komplexen in MES/Tris (je 0,2 mmol/l) pH 7,1; Detektion mit UV bei 210 nm; a) Al(III)-EDDHA, b) Fe(III)-EDDHA, c) freies EDDHA, d) Ga(III)-EDDHA, e) Ni(II)-EDDHA, f) Zn(II)-EDDHA	100
Abbildung 26: Retentionsverhalten von Standardmetaboliten (1) Phenylalanin, 2) Alanin, 3) Glutaminsäure, 4) Glutathion, 5) Asparaginsäure, 6) Histidin, 7) Citrat 8) Arginin; Konzentration 10 μ mol/l auf verschiedenen HILIC-Säulenmaterialien (a) Kinetex HILIC (Silicaphase), b) Luna HILIC (Diolphase), c) Macherey-Nagel (zwitterionische Sulfobetainphase), d) Zic HILIC (zwitterionische Sulfobetainphase), e) Amide-80 (Amidphase)); pH-Wert 5,5; 10 mM NH ₄ Ac; Gradient von 99 % ACN, 1 % H ₂ O bis 45 % ACN, 55 % H ₂ O (Bedingungen siehe Material und Methoden)	113
Abbildung 27: Chromatographische Trennung von a) freiem EDTA und b)	116
Abbildung 28: Chromatogramm der Direktinfusion einer Eisen-Citrat-Mischung mit 1 mM Eisen(III) und 2 mM Zitronensäure bei einem pH Wert von 5,5, Die Abkürzung (Cit) ⁴⁻ bezieht sich auf die Summenformel C ₆ H ₄ O ₇ ⁴⁻	119
Abbildung 29: Isotopenmuster von Eisen-Citrat-Spezies, oben: gemessenes Muster, unten: mit Xcalibur simuliertes Muster; A) [Fe ₃ Cit ₃] ²⁻ m/z=366,4; B) [Fe ₃ Cit ₃ (H ₂ O)] ²⁻ m/z=375,9; C) [Fe ₃ Cit ₄] ²⁻ m/z=462,4; D) [Fe ₃ Cit ₃] ⁻ m/z=733,8; E) [Fe ₃ Cit ₃ (H ₂ O)] ⁻ m/z=751,8; F) [Fe ₃ Cit ₄] ⁻ m/z=925,8	121
Abbildung 30: MS ² von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) A) [Fe ₃ Cit ₃] ²⁻ m/z=366,4; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten)	123
Abbildung 31: MS ² von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) [Fe ₃ Cit ₃ (H ₂ O)] ²⁻	

- m/z=375,9; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten) **124**
- Abbildung 32: MS² von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) D) [Fe₃ Cit₃]⁻ m/z=733,8; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten) **125**
- Abbildung 33: Eine Struktur des [Fe₃ Cit₃]⁻-Komplexes (m/z=733,8) in wässriger Lösung nach [26] **125**
- Abbildung 34: MS² von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) E) [Fe₃ Cit₃ (H₂O)]⁻ m/z=751,8; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten) **126**
- Abbildung 35: MS² von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) C) [Fe₃ Cit₄]²⁻ m/z=462,4; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten) **127**
- Abbildung 36: MS² von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) F) [Fe₃ Cit₄]⁻ m/z=925,8; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten) **128**
- Abbildung 37: Entwicklung der Spezieszusammensetzung von Eisen-Citrat-Komplexen mit Veränderung des Verhältnisses von Eisen zu Citrat: a) freies Citrat; b) [Fe₃ Cit₃]²⁻; c) [Fe₃ Cit₃ H₂O]²⁻; d) [Fe₃ Cit₃]⁻; e) [Fe₃ Cit₃ H₂O]⁻; f) [Fe₃ Cit₄]²⁻; g) [Fe₃ Cit₄]⁻ **130**
- Abbildung 38: Reproduzierbarkeit und Linearität der Signalfächen bei zunehmender Konzentration von Eisen und Citrat bei gleichbleibendem Verhältnis von 1/2; untersuchte Spezies: ■ [Fe₃ Cit₃]²⁻, ▲ [Fe₃ Cit₃ H₂O]²⁻, X [Fe₃ Cit₄]²⁻, ж [Fe₃ Cit₃]⁻, ● [Fe₃ Cit₃ H₂O]⁻, Δ [Fe₃ Cit₄]⁻ **131**
- Abbildung 39: Direktinfusion einer Kupfer-Histidin-Mischung mit 1mM Kupfer und 5mM Histidin mit einem pH Wert von 5,5 (Zuordnung in Tabelle 9) **133**
- Abbildung 40: Isotopenmuster von Kupfer-Histidin-Spezies, oben: gemessenes Muster, unten: mit Xcalibur simuliertes Muster; A) [Cu His₂]⁻ m/z=370,0; B) [Cu His₂ Ac]⁻ m/z=430,1; C) [Cu His₃]⁻ m/z=525,1; D) [Cu₂ His₄]⁻ m/z=741,1; E) [Cu₃ His₅]⁻ m/z=959,1 **134**
- Abbildung 41: MS² von Kupfer-Histidin-Spezies (* = Parention) A) [Cu His₂]⁻ m/z=370,0; Fragmentierung mit steigender Kollisionsenergie (10, 20, 30, 40 % normierter Kollisionsenergie, von oben nach unten) **135**
- Abbildung 42: MS² von Kupfer-Histidin-Spezies (* = Parention) B) [Cu His₂ Ac]⁻

- m/z=430,1; Fragmentierung mit steigender Kollisionsenergie (10, 20, 30, 40 % normierter Kollisionsenergie, von oben nach unten) **136**
- Abbildung 43: MS² von Kupfer-Histidin-Spezies (* = Parention) C) [Cu His₃]⁻
m/z=525,1; Fragmentierung mit steigender Kollisionsenergie (10, 20, 30, 40 % normierter Kollisionsenergie, von oben nach unten) **136**
- Abbildung 44: MS² von Kupfer-Histidin-Spezies (* = Parention) D) [Cu₂ His₄]⁻
m/z=741,1; Fragmentierung mit steigender Kollisionsenergie (10, 20, 30, 40 % normierter Kollisionsenergie, von oben nach unten) **137**
- Abbildung 45: Trennung I: Trennung von Eisen-Citrat-Spezies auf drei verschiedenen HILIC-Phasen, I) Diolphase (Luna HILIC), II) Amidphase (Amide-80), III) zwitterionische Sulfbobetainphase (Zic HILIC); Signal a) 3:3-Stöchiometrie; b) 1:2- und 3:4-Stöchiometrie **139**
- Abbildung 46: Trennung von Eisen-Citrat-Spezies auf einer I) Amidphase (Amide-80) II) Diolphase (Luna HILIC) und III) zwitterionischen Sulfbobetainphase (Zic HILIC); exakte Zusammensetzung der zwei resultierenden Signale; gezeigte Spezies sind a) [Fe Cit₂]⁻, b) [Fe₃ Cit₄]²⁻, c) [Fe₃ Cit₄]⁻, d) [Fe₃ Cit₃]²⁻, e) [Fe₃ Cit₃ H₂O]²⁻, f) [Fe₃ Cit₃]⁻; die Chromatogramme wurden mit der Xcalibur-Software geglättet (5pt) **141**
- Abbildung 47: Trennverhalten von Eisen-Citrat (a, b) und freiem Citrat (c) (Eisen 100 µmol/l, Citrat 10 mmol/l) in der Trennung mit CE und Detektion mit C⁴D, MES/TRIS (20/20 mM) pH 7,3 **145**
- Abbildung 48: Vergleich der beiden verwendeten Detektoren A) C⁴D B) UV für die CE-Trennung eines Eisen-Citrat-Standards (zwei Replikate) (a) und freien Citrates (b), MES/TRIS (20/20 mM) pH 7,3 **147**
- Abbildung 49: Chromatographische Trennung von Kupfer-Histidin-Spezies: I) [Cu His₂]⁻; II) [Cu His₃]⁻; III) [Cu₃ His₃]⁻; IV) [Cu₂ His₄]⁻; V) [Cu₃ His₅]⁻ auf 3 verschiedenen HILIC-Phasen: A) Diolphase (Luna HILIC); B) zwitterionische Sulfbobetainphase (Zic HILIC); C) Amidphase (Amide-80) **149**
- Abbildung 50: CE-UV-Spektren einer Kupfer-Histidin-Mischung mit 1 mmol/l Histidin und 10, 30, 50, 100 µmol/L Kupfer; a) freies Kupfer mit zunehmender Höhe bei zunehmender Konzentration, b) CuHis-Signal mit zunehmender Höhe bei zunehmender Konzentration (vermutlich Cu(His)₂), c) CuHis-Signal nur bei geringster Cu-Konzentration (evtl. Cu(His)₃), d) freies Histidin **151**
- Abbildung 51: Leitfähigkeitsdetektion von CE-Trennungen mit C⁴D von a) Cu²⁺ b)

Histidin (1 mmol/l)+Kupfer 50 µmol/l	152
Abbildung 52: Kalibration des Kupfergehaltes in der CE-Trennung A) Leitfähigkeitsdetektion mit C ⁴ D, B) UV-Detektion	153
Abbildung 53: Chromatographische Trennung eines Extraktes von Gerstenblättern (Hordeum vulgare) dotiert mit Eisen-Citrat-Standard mit 0,5 mM/l Eisen und 1 mM/l (entspricht ca. 30 µg Fe/ml in der Probe) Citrat auf einer Amidphase (Amide-80); a) [Fe ₃ Cit ₃] ²⁻ , [Fe ₃ Cit ₃ H ₂ O] ²⁻ , [Fe ₃ Cit ₃] ⁻ , b) [Fe ₃ Cit ₄] ²⁻ , [Fe ₃ Cit ₄] ⁻ ; Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 99:1 ACN/H ₂ O bis 45:55 ACN/H ₂ O; 10 mM Ammoniumacetat	156
Abbildung 54: Eisen-Citrate in einem Wasserextrakt aus Gerstenblättern (h2E2OL); —[Fe(cit) ₂] ⁻ ; Fe ₂ (cit) ₂] ⁻ ; ---[Fe ₃ (cit) ₄] ⁻ ; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H ₂ O bis 45:55 ACN/H ₂ O	157
Abbildung 55: CE-Messung von Eisen-Citraten in zwei Proben (a, b) von Gerstenextrakten (A) und einer Eisen-Citrat-Modellmischung (zwei Replikate) (B); MES/TRIS (20/20 mM), pH 7,3	159
Abbildung 56: Messung von Eisen-Citraten in zwei Gerstenextrakten (Versuch hE3OL), Vergleich von A) -Fe+S; B) CK+S; CE-Trennung von jeweils 3 Replikaten, MES/TRIS (20/20 mM), pH 7,3	160
Abbildung 57: Übereinstimmung bei der Bestimmung von Eisen-Citraten mit A) HPLC/MS und B) CE-C ⁴ D	161
Abbildung 58: Demonstration der Vergleichbarkeit von UV- (gestreift) und C ⁴ D- Detektion (gepunktet) am Beispiel von Eisen-Citraten in Gersteextrakten, Standardabweichungen der Messungen von jeweils 5 Replikaten	162
Abbildung 59: Trennung eines Extraktes von Gerstenblättern (Hordeum vulgare) gespikt mit Kupfer-Histidin-Standard mit 1 mM Kupfer und 5 mM Histidin auf einer Diolphase (Luna HILIC); a) Histidin, [CuHis ₃] ⁻ ; b) [Cu ₃ His ₃] ⁻ , [Cu ₂ His ₄] ⁻ , [Cu ₃ His ₅] ⁻ ; Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 99:1 ACN/H ₂ O bis 45:55 ACN/H ₂ O; 10 mM Ammoniumacetat	163
Abbildung 60: Freies Histidin und Kupfer-Histidin in einem Wasserextrakt aus Gerstenblättern; durchgezogene Linie: freies Histidin, gestrichelte Linie: [Cu ₂ (His) ₄] ⁻ ; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H ₂ O bis 45:55 ACN/H ₂ O; Isotopenmuster von [Cu ₂ (His) ₄] ⁻ , Vergleich Messung und Simulation	

- mit Xcalibur (Profile, R: 25000, FWHM) **164**
- Abbildung 61: Standardabweichungen bei den Messungen der biologischen Replikate (jeweils 5 Proben) dargestellt am Beispiel des Citrates; alle anderen Analyten zeigten vergleichbare Abweichungen **168**
- Abbildung 62: Eisen-Citrate in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.33; dunkelgrün: $[\text{Fe}(\text{cit})_2]^-$; blau: $\text{Fe}_2(\text{cit})_2^-$; hellgrün $[\text{Fe}_3(\text{cit})_4]^-$; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O **171**
- Abbildung 63: Kupfer-Histidin, $[\text{Cu}_2(\text{His})_4]^-$ in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.33; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O **172**
- Abbildung 64: Mugineinsäurekomplexe mit verschiedenen Metallen in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.33; blau: MA, violett: MA-Ni, gelb: MA-Cu, grün: MA-Zn, orange: MA-Mn(II), lila: MA-Fe(III); Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O **174**
- Abbildung 65: 2'-Deoxymugineinsäure und DMA-Komplexe mit verschiedenen Metallen in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.33; blau: DMA, violett: DMA-Ni, gelb: DMA-Cu, grün: DMA-Zn, orange: DMA-Mn(II), lila: DMA-Fe(III); Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O **175**
- Abbildung 66: Hydroxymugineinsäure und HMA-Komplexe mit verschiedenen Metallen in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung Tabelle 1, S.33; blau: HMA, violett: HMA-Ni, gelb: HMA-Cu, grün: HMA-Zn, orange: HMA-Mn(II), lila: HMA-Fe(III); Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O **176**
- Abbildung 67: Nicotianamin und NA-Komplexe mit verschiedenen Metallen in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.33; blau: NA, violett: NA-Fe(III), gelb: NA-Ni, grün: NA-Zn, orange: NA-Mn(II),

-
- lila: NA-Cu; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC),
Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55
ACN/H₂O **177**
- Abbildung 68: Scatterplots, Vergleich -Fe mit CK (h2E2OL, Massenbereich I)
Diagramm oben; Vergleich der Replikate CK (h2E2OL, Massenbereich I) **180**
- Abbildung 69: Streudiagramm für den Vergleich des Eisenmangelzustandes (-Fe) mit
der dazugehörigen Kontrolle (CK) aus Versuch h2E2SOL; untersuchter
Massenbereich II (150-500) **181**
- Abbildung 70: Auffällig abweichende Signale in der Auswertung der Streudiagramme
-Fe / -Fe-N im Vergleich mit der zugehörigen Kontrolle, Abweichung in Prozent
der Signalfäche **182**
- Abbildung 71: α -Ketoglutarat in den Proben aus Experiment 2 (h2E2SOL), die
Proben (a) mit Seneszenz durch Stickstoffmangel (-N) zeigen einen deutlich
erhöhten Gehalt an α -Ketoglutarat als die Kontrollen (b) **183**
- Abbildung 72: Chromatographische Trennung zweier Signale mit $m/z=145,01425$; die
Fragmentierung im MS²-der einzelnen Signale stimmt gut überein und
unterstützt die Zuordnung der Signale zu β - (9,7 min) und α -Ketoglutarat (18,5
min) **186**
- Abbildung 73: Metaboliten des Citratzyklus und isomere Verbindungen, ausgewählte
 m/z im Vergleich der unterschiedlichen Ernährungszustände,
Standardabweichungen der biologischen Replikate; A: Fumarat ($m/z=115,0036$);
B: Isocitrat ($m/z=191,0197$); C: α -Ketoglutarat ($m/z=145,0142$); D: Citrat
($m/z=191,0197$) **187**
- Abbildung 74: Gesamtübersicht über die mit dem Citratzyklus zusammenhängenden
Metaboliten (inklusive isomeren Signale), x-Achse: Versuchsnummern; y-Achse:
 m/z -Verhältnisse; Die detaillierten Auswertungen der einzelnen Metaboliten mit
Standardabweichungen finden sich im Anhang **188**
- Abbildung 75: Gesamtübersicht über Aminosäuren in Gerstepflanzen mit
unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1;
Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC),
Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55
ACN/H₂O; Die Auswertung der einzelnen Aminosäuren mit
Standardabweichungen finden sich im Anhang **189**
- Abbildung 76: Aminosäuren in Gerstepflanzen mit unterschiedlichen

- Ernährungszuständen; Asparagin (gepunktet) und Glutamin (gestreift);
Experimentplanung s. Tabelle 1; Trennung auf einer zwitterionischen
Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution
95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O **191**
- Abbildung 77: links: PCA ältestes Blatt (h1E2OL), Vergleich Eisenmangel (-Fe) vs.
Kontrolle (CK); rechts: PCA zweitältestes Blatt (h1E2SOL), Vergleich
Eisenmangel (-Fe) vs. Kontrolle (CK); Massenbereich 150-500 **193**
- Abbildung 78: PCA-Analyse des zweiten Experimentes (Seneszenzauslösung durch
Stickstoffmangel, Tabelle 1), untersucht wurde das zweitälteste Blatt (h2E2SOL);
die Proben mit Stickstoffmangel (-N), mit Eisenmangel (-Fe), mit Eisen- und
Stickstoffmangel (-Fe -N) unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (CK)
und voneinander **194**
- Abbildung 79: PCA-Analyse des zweiten Experimentes (Seneszenzauslösung durch
Stickstoffmangel, Tabelle 1), untersucht wurde das älteste Blatt (h2E2OL); die
Proben mit Stickstoffmangel (-N), mit Eisenmangel (-Fe), mit Eisen- und
Stickstoffmangel (-Fe -N) unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (CK)
und von einander **195**
- Abbildung 80: PCA-Analyse des dritten Experimentes (Seneszenz durch
Beschattung, Tabelle 1), untersucht wurde das älteste Blatt (hE3OL); die Proben
mit Eisenmangel (-Fe), mit Eisenmangel und beschattet (-Fe, S), Kontrolle
beschattet (CK+S) unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (CK) und
voneinander **196**
- Abbildung 81: PCA-Analyse des Experiment 3 (Seneszenz durch Beschattung,
Tabelle 1), untersucht wurde das zweitälteste Blatt (hE3SOL); die Proben mit
Eisenmangel (-Fe) und mit Eisenmangel und beschattet (-Fe, S) unterscheiden
sich signifikant von Kontrolle beschattet (CK+S) und der Kontrolle (CK), die zwei
Gruppen -Fe und -Fe+ S sowie CK und CK+S lassen sich in diesem Fall nicht
eindeutig unterscheiden; Massenbereich 150-500 m/z **197**

Zusammenfassung

Für das Verständnis von Metalltransportprozessen auf molekularer Basis wird in der Pflanzenbiologie großer Forschungsaufwand betrieben. Besonders über kleine Metallspezies ist fast nichts bekannt, wobei ein zentrales Problem für die Entwicklung analytischer Methoden die geringe Stabilität der Metallspezies ist. Notwendige Trennungen stellen immer eine Störung bestehender Gleichgewichte dar (Dissoziation); sowie eine Konzentrationsverringernung. Diese Arbeit soll dazu beitragen die Lücke im Methodenspektrum zur Analyse und Konzentrierung labiler Metallspezies zu verkleinern und damit Möglichkeiten eröffnen, den Metalltransport im Xylem zu untersuchen.

In einem völlig neuen Ansatz wurde die Fokussierbarkeit von Metallspezies an einem Isoelektrischen Punkt (pI) nachgewiesen. Auf Basis Isoelektrischer Fokussierung (IEF) wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem labile Metallspezies erstmals konzentriert und gleichzeitig ein Großteil der Matrixbestandteile abgetrennt werden konnten. Die Anwendbarkeit für biologisches Probenmaterial wurde gezeigt, bis hin zur Möglichkeit einer zweidimensionalen Trennung, kombiniert mit einer HPLC-Trennung.

Citrat-Komplexe sind von besonderem Interesse, da ihnen eine wichtige Rolle im Xylemtransport von Eisen zugeschrieben wird. Bisher gab es auf molekularer Ebene keine Informationen über ihre Identität, bzw. Stöchiometrie. Daher wurde ein Analyseverfahren entwickelt, mit dessen Hilfe es gelang, bisher unbekannte Eisen-Citrat-Spezies zu trennen und zu identifizieren. Die Existenz der im Modellsystem identifizierten Spezies wurde in biologischen Matrices nachgewiesen und so die Anwendbarkeit der HPLC-MS-Methode bewiesen.

Um neben der Untersuchung der einzelnen Eisenspezies auch einen Überblick über Gleichgewichte mit anderen Metallverbindungen und Metaboliten in einer pflanzenbiologischen Probenreihen zu gewinnen, wurden mit der entwickelten HPLC-MS-Methode neben den labilen Citratkomplexen, auch stabile Phytosiderophorkomplexe und viele Metabolite in einem Analysenschritt erfasst. So konnten erstmalig verschiedene Pflanzen-Ernährungszustände unter Einbeziehung definierter Eisenspezies signifikant unterschieden, und so Hypothesen zum Eisentransport in seneszenten Pflanzen verifiziert werden.

Durch die Neuentwicklungen dieser Arbeit ist es gelungen, das analytische

Methodenspektrum für kleine labile Metallspezies so zu erweitern, dass neben der Konzentrierung und Analyse einzelner Spezies konkrete biologische Fragestellungen erfolgreich beantwortet werden konnten.

Summary

Great effort is made in biological research to understand metal transport processes in plants on the molecular level. A central problem in the development of analytical methods is the limited stability of small metal species. In particular, the separation procedures inevitably required may disturb equilibria and reduce the concentration of species. Hence, very little is known about such species. The intention of this work is to develop new methods suitable for the analysis and concentration of labile metal species and thus to enable the investigation of xylem metal transport.

In a completely new approach, the focusability of metal species at a particular isoelectric point (pI) was demonstrated. A procedure based on isoelectric focussing (IEF) was established to concentrate metal species while separating most of the matrix. The applicability to biological samples was demonstrated, including two-dimensional separations (IEF-HPLC).

Citrate complexes are suspected to play an important role in iron xylem transport and are therefore of special interest. However, the exact stoichiometry of iron species has not been identified yet. Hence, a new analytical method was developed for the separation and identification of previously unknown citrate species. Applicability of this HPLC-MS method to plant samples was verified and respective iron citrate species were identified.

Besides the analysis of labile iron citrate species, stable phytosiderophore species and metabolites were determined simultaneously using the new method in a series of biological samples to gain an overview over equilibria with other metal species and metabolites. Nutritional states of plants could be distinguished on the basis of well-defined iron species, thus enabling verification of hypotheses concerning the iron transport in senescent plants. Thanks to the new approaches of this work, it was possible to expand the spectrum of analytical methods for labile metal species. Besides concentration and analysis of single species, concrete biological questions were answered.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Metallen in der Pflanzenernährung

In der Pflanzenernährung spielen neben den Hauptelementen, aus denen organische Substanz besteht – Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff – und den Makronährstoffen auch essentielle Mikronährstoffe eine große Rolle. Bei den Makronährstoffen handelt es sich um Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Kalium, Magnesium und Kalzium. Sie werden neben den Kernelementen für den Aufbau von biologischen Molekülen (Biomasse) benötigt und als Osmotika eingesetzt. Die Mikronährstoffe Eisen, Kupfer, Mangan, Zink, Nickel, Bor, Chlor und Molybdän dienen überwiegend als Kofaktoren für Enzyme. Ein Beispiel ist das Eisen, das aufgrund seiner Redoxeigenschaften als Kofaktor für Enzyme dient, die Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen katalysieren. Eisen kann in verschiedenen Oxidationsstufen (zwei- oder dreiwertig) auftreten und ist an Prozessen wie dem Citratzyklus, der Photosynthese und der Zellatmung beteiligt. Damit ist es ein wichtiges Element für die Energiegewinnung der Pflanze. Neben Eisen ist Kupfer ein weiteres Beispiel für einen redoxaktiven Kofaktor und als solcher am Elektronentransport bei der Photosynthese, genauso wie an der Chlorophyllproduktion und am Zellwand-Metabolismus beteiligt. Kupfer ist über Enzyme wie z. B. Cytochrom-C-Oxidase, Amino-Oxidase, Polyphenol-Oxidase u. a. in Oxidations- und Reduktionsreaktionen involviert.

Das Wirkungsoptimum der oben genannten Mikronährstoffe in der Pflanzenernährung ist sehr schmal. Zu geringe Mengen führen zu Mangelerscheinungen, da die Pflanzenentwicklung gehemmt wird, und ein Überschuss kann in der Pflanze schwere Schäden durch oxidativen Stress auslösen. Die Pflanze muss also in ihrer Regulation sowohl auf Mangel als auch auf Überschusszustände reagieren können.

Oft erweisen sich Metalle als limitierende Faktoren bei der Pflanzenernährung, wobei Eisen eines der häufigsten Mangel-elemente ist. Bei Eisen handelt es sich zwar um das vierthäufigste Element in der Erdkruste, aber auf vielen Böden ist die Verfügbarkeit zu gering, um den Bedarf der Pflanzen vollständig zu decken. In neutralen und alkalischen Böden liegt Eisen hauptsächlich als Oxid oder Hydroxid vor, die beide eine sehr geringe Löslichkeit besitzen. Bei neutralem pH-Wert beträgt

die Konzentration freier Eisenionen nur 10^{-17} mol/L [1]. Das genügt nicht, um die Versorgung von Pflanzen sicherzustellen, da höhere Pflanzen freies Eisen in nM- bis mM-Konzentrationen benötigen. In der Literatur werden Eisenkonzentrationen zwischen 10^{-9} und 10^{-4} mol/L [2-3] als notwendig erachtet. Da ca. 1/3 der landwirtschaftlich genutzten Erdoberfläche aus alkalischen Böden besteht [4], ist der Mangel an Eisen ein zentrales Problem vieler Pflanzen und daher in der Landwirtschaft von großem wirtschaftlichem Interesse. Auch in der menschlichen pflanzenbasierten Ernährung ist Eisenmangel immer noch ein großes Problem. Laut der WHO leiden in Entwicklungsländern 42 % aller Frauen, 39 % der Kinder von 0-4 Jahren und 48 % der Kinder von 5-14 Jahren an Anämie (Jahre 1990-1995), die durch Eisenmangel hervorgerufen wird [Iron-Deficiency Anaemia – Assessment, Prevention and Control; WHO 2001]. Der Grund für den Eisenmangel liegt in einer einseitigen vegetarischen Ernährung auf Getreidebasis (Reis, Mais), deren Eisengehalt nicht ausreichend ist.

1.2 Eisenaufnahmewege der Pflanzen

Die große Bedeutung für die Pflanzen- und die menschliche Ernährung macht Eisen zu einem der am besten untersuchten Mikronährstoffe. Im Gegensatz zum Transport von Eisen innerhalb der Pflanze ist die Aufnahme von Eisen in Pflanzen gut untersucht. Die im Folgenden beschriebenen Aufnahmewege wurden lange hauptsächlich als reine Eisenaufnahmewege betrachtet und analysiert. Aber auch andere Metallkationen werden auf diese Weise in die Pflanze aufgenommen, da die Substratspezifität der Aufnahmemechanismen eher gering ist.

Die Regulierung der Metallaneignung wird über den Eisenernährungszustand gesteuert, was bedeutet, dass Eisenmangel die Verstärkung dieser Aufnahmemechanismen induziert. Eine Induzierung aufgrund des Mangels an anderen essentiellen Metallkationen wird diskutiert [5], konnte aber bis jetzt nicht bewiesen werden.

Um einem Mangel an Eisen zu begegnen, existieren in der Pflanzenwelt zwei unterschiedliche aktive Aufnahmestrategien. Pflanzen, mit Ausnahme der Gräser (Poaceen), wenden dabei eine redox-basierte Strategie (Strategie I) an. Sie sind in der Lage, durch Ausscheidung von Protonen den pH-Wert in der Rhizosphäre abzusenken und so Eisenionen zu mobilisieren. Die dadurch verfügbaren Eisen-(III)-

Ionen werden an der Rhizodermis zu Eisen-(II) reduziert und über ein spezifisches Aufnahmesystem in die Pflanze transportiert [6]. Dieser Aufnahmeweg ist nur gering substratspezifisch. Auch andere Metalle werden so in die Pflanze aufgenommen [7-8].

Die Poaceen bilden die Gruppe der Strategie-II-Pflanzen und realisieren eine aktive Eisenaufnahme über Chelatbildung. Strategie-II-Pflanzen scheiden sogenannte Phytosiderophore, die Eisen-(III) aus den schwerlöslichen Komplexen im Boden heraus binden können, in die Rhizosphäre aus. Bei den Phytosiderophoren handelt es sich um Chelatbildner für Metallionen, die ausgehend von Nicotianamin (NA) mit Hilfe des Enzyms Nicotianamin-Aminotransferase (NAAT) synthetisiert werden [9-10] und strukturell dem NA sehr ähneln [11-13] (s. Abbildung 1).

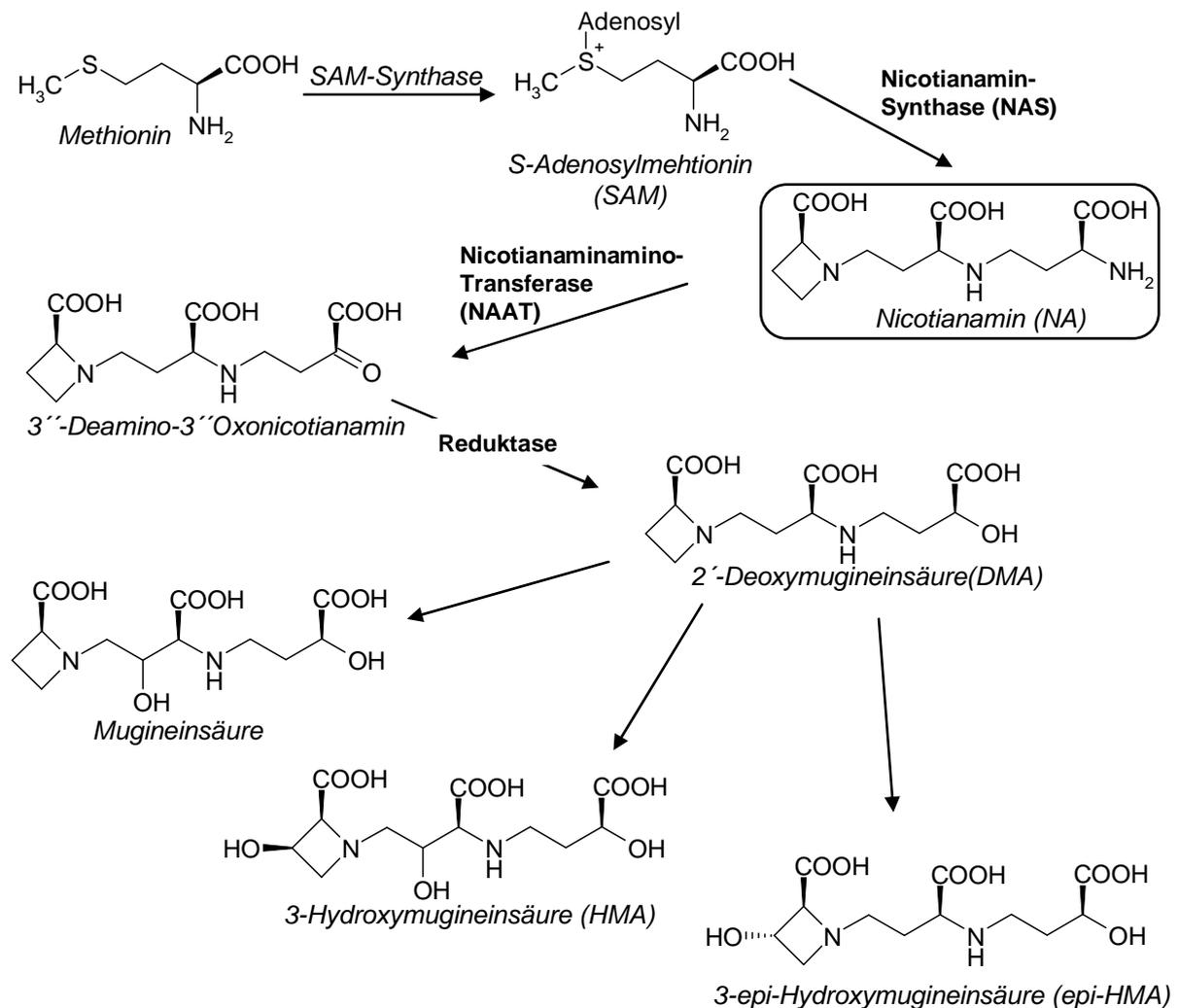


Abbildung 1: Biosynthese von Phytosiderophoren (PS)

Das Phytosiderophorenmuster in unterschiedlichen Pflanzenspezies und Cultivaren ist stark unterschiedlich [14]. Die außerhalb der Wurzel gebildeten Metall-Phytosiderophor-Komplexe werden über Transportsysteme in der Wurzelmembran unzerstört aufgenommen [15-17].

Mehrere Arbeiten konnten nachweisen, dass über das Transportsystem für Phytosiderophorkomplexe auch andere Metallkationen wie Zink, Kupfer, Mangan, Nickel und Cadmium als PS-Komplexe in die Pflanze transportiert werden [18-21].

Die Regulation von Aufnahme und Verteilung von essenziellen Metallen ist bei Strategie-I- und Strategie-II-Pflanzen hoch organisiert und sehr komplex [22-24]. Während die Aufnahmeformen und die dazugehörigen Transporter inzwischen bekannt sind, sind die molekularen Details der Homöostase bisher weitgehend ungeklärt. Abbildung 2 dokumentiert schematisch den bisherigen Kenntnisstand über Transportliganden und Oxidationsstufen des Eisens bei verschiedenen Stationen des Transportes. Nach der Aufnahme in die Pflanze müssen die Metalle, ausgehend von der Wurzel, in der Pflanze verteilt werden. In der Darstellung wird deutlich, durch wie viele Kompartimente das Eisen auf dem Weg zu den bedürftigen Organen transportiert wird. Dass dies in Form freier Kationen geschieht, ist aus zwei Gründen nicht möglich: Zum einen würden freie Metallkationen der Zelle aufgrund ihrer Reaktivität schaden. Zum anderen bestünde die Gefahr, dass die Kationen je nach vorliegendem pH-Wert und Reaktionspartnern zu schwerlöslichen Produkten reagieren und damit nicht mehr verfügbar sind. Der Transport der Metalle durch die Pflanze und ihre Kompartimente ist deshalb nur in komplexierter Form möglich. Da alle Kompartimente unterschiedliche chemisch-physikalische Bedingungen, wie unterschiedliche pH-Werte, Redox-Potenziale und unterschiedliche Konzentrationen von Metaboliten und potentiellen Liganden aufweisen, liegt es nahe, dass unterschiedliche Liganden beim Transport eine Rolle spielen. In Abbildung 2 wird deutlich, dass sowohl das Xylem als auch das Phloem als Transportweg für Metalle dienen. Die chemische Umgebung ist hier sehr unterschiedlich: Für den Xylemtransport ist Citrat ein sehr wahrscheinlicher Kandidat, im Phloem ist bisher hauptsächlich NA als Transportligand bekannt. NA bildet 1:1-Komplexe; für die Komplexbildung mit Citrat wurde bisher in Tomaten ein 2:2-Komplex identifiziert [25], in Modellsystemen wurden weitere Stöchiometrien identifiziert [26-27]. Für Strategie-II-Pflanzen ist so gut wie nichts bekannt.

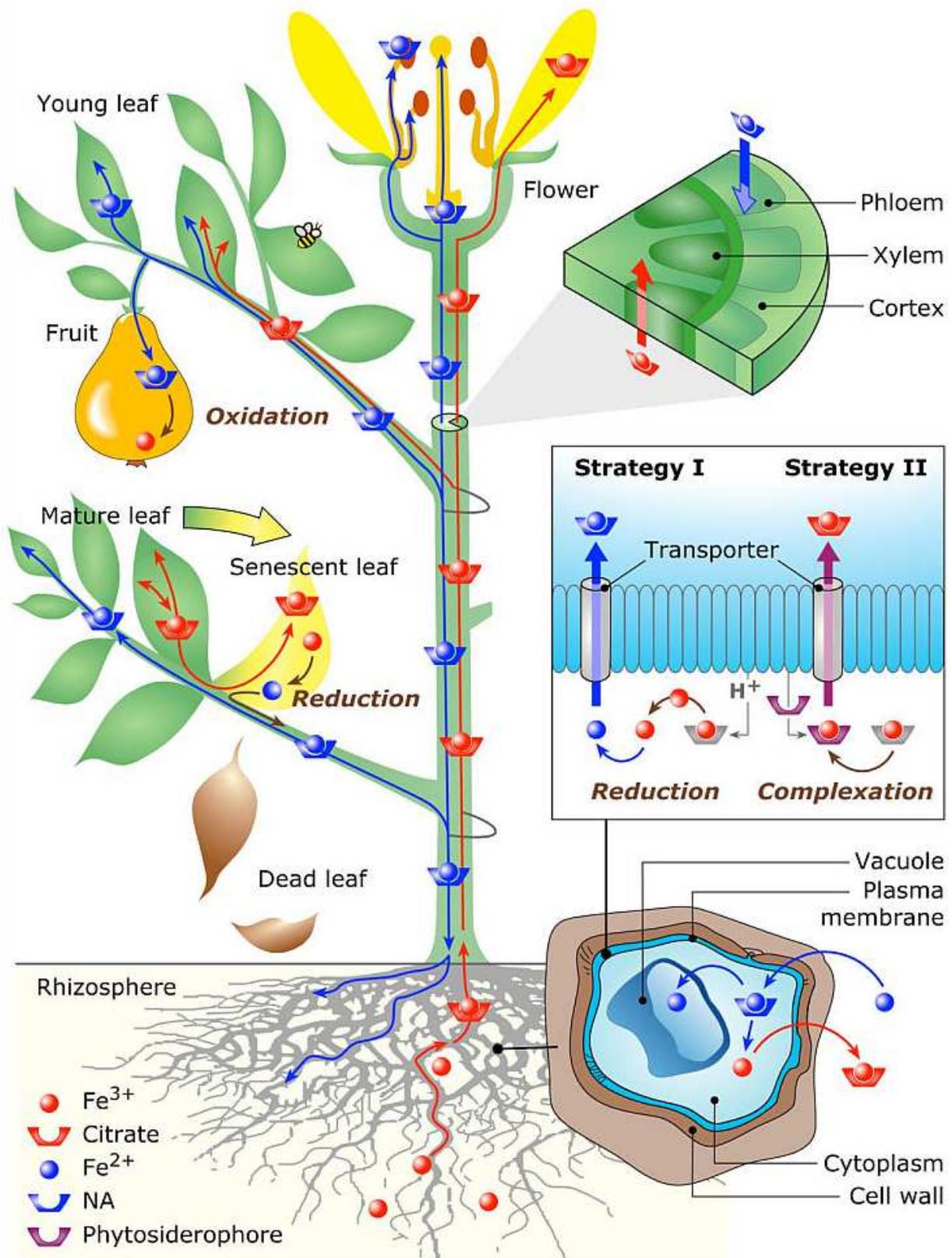


Abbildung 2: Modell der Aufnahme und des Transportes von Eisen in Pflanzen mit Schwerpunkt auf dem Wechsel der Eisenbindungsformen (aus Blankenburg, von Wirén, Gülke, Weiss & Bullen 2009, Elements 5, 375-380)

Neben dem reinen Transport ist die Komplexierung auch eine gute Möglichkeit, toxische Mengen von Metallkationen in der Pflanze in einer unreaktiven Form zu speichern und sie so aus dem Gleichgewicht in der Zelle zu entfernen. Als Lagerort für Metalle dient die Vakuole, in die die komplexierten Metalle transportiert werden.

Welche Liganden neben den Genannten den Metalltransport in der Pflanze übernehmen und welche Spezies dabei eine Rolle spielen, ist allerdings bisher kaum erforscht. Daher wird im biologischen Bereich auf diesem Gebiet intensive Forschung betrieben, die bisher aber nur auf der Analyse von Metallgehalten und Gehalten möglicher Liganden beruht und nicht deren Komplexe untersucht. Es werden die Zusammenhänge zwischen Metall- und Ligandengehalten betrachtet und daraus Rückschlüsse auf die Ernährungssituation der Pflanze gezogen [28-33]. Doch Konzentrationsangaben zu Metallen und den unkomplexierten Liganden sind wenig aussagekräftig. Um die molekularen Zusammenhänge der Homöostase zu begreifen, sind Aussagen über die tatsächlich gebildeten Spezies nötig. Die verwendete Analytik muss also die Möglichkeit bieten, intakte Metallkomplexe zu analysieren. Doch dafür gibt es bisher kaum geeignete Analytik.

1.3 Analytik von Metallspezies in Pflanzen

In der herkömmlichen Analytik liegt der Fokus meist darauf, die Gesamtgehalte definierter Analyten zu bestimmen. Je nach Analysenmethode wird auch die genaue Struktur bestimmt. Die anorganische Analytik, wie AAS oder ICP-MS, dient dazu, die Gesamtgehalte von Metallen, unabhängig von ihrer Bindungsform, zu bestimmen.

Die Aussagekraft von Gesamtgehalten ist aber für biologische Fragestellungen nicht ausreichend. Es ist nötig, die tatsächlich vorhandenen Elementspezies zu erfassen, um Schlussfolgerungen über deren Bedeutung im Organismus ziehen zu können.

Bei Elementspezies handelt es sich per Definition nach Ure et al. (1995) um sämtliche physikalischen und chemischen Zustands- und Bildungsformen eines Elementes, die in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen auftreten können. Die Speziesanalytik bietet auch die Möglichkeit, einen näheren Einblick in die Wirkung essenzieller Metalle in Pflanzen zu gewinnen. Der Wissenstand ist in diesem Bereich bisher eher gering. Von der biologischen Seite aus wurden und werden viele Ansätze verfolgt, um Metallspezies in Pflanzen zu identifizieren. Die für die Speziesanalytik existierenden Methoden sind derzeit aber hauptsächlich zur

Analyse einiger stabiler Spezies geeignet. Die Analytik zur Identifizierung und Quantifizierung von labilen Spezies und Speziesgleichgewichten in Pflanzen ist dagegen kaum entwickelt. Bei der Betrachtung der Stabilität spielen unterschiedliche Aspekte eine Rolle. Bei der thermodynamischen Stabilität geht es vor allem um die Elektronenkonfiguration, die das Zentralatom des Komplexes erreicht, die kinetische Stabilität hängt dagegen von der Art der Liganden ab, bzw. der hieraus resultierenden Geschwindigkeit der Austauschreaktionen.

Der Mangel an entsprechenden Analysemethoden ist darauf zurückzuführen, dass labile Spezies durch die Methode selbst verändert werden können, so dass ein Rückschluss auf die ursprünglich vorhandenen Spezies nicht mehr möglich ist. Außerdem ist die Konzentration der Analyten in Proben sehr gering, da es sich bei Metallen um Mikronährstoffe handelt und darüber hinaus der gesamte Metallgehalt auf eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies verteilt ist, so dass der Gehalt einzelner Spezies ggf. nahe oder sogar unter der Nachweisgrenze liegt. Schließlich liegt in Metallchelaten eine nicht-kovalente Bindung vor, deren Stabilität deutlich geringer ist als bei Analyten mit kovalenten Bindungen. Vor allem ist die Stabilität vieler Komplexe während der Trennungen häufig nicht bekannt. Bei Trennungen werden existierende Gleichgewichte gestört und die chemische Umgebung verändert. Eine Problematik, die bereits für die Analytik von Nickelspezies [34], ebenso wie für die Analytik von Eisen-Phytosiderophor-Komplexen [35] berichtet wurde. Auch thermodynamisch stabile Phytosiderophorspezies können einer partiellen Dissoziation auf chromatographischen Säulen unterliegen [36-37].

Die Stabilität von Metallchelaten hängt unter anderem maßgeblich vom pH-Wert ab. Es kann zur Dissoziation der Komplexe oder zu Austauschreaktionen mit freien Liganden kommen [17]. Eine Übersicht am Beispiel eines ungeladenen 1:1-Komplexes aus Eisen-(III) mit dem Liganden L und der Gesamtladung 0 bietet Abbildung 3. Eisenchelate sind aufgrund der Redoxaktivität des Eisens besonders von Ligandenaustauschreaktionen betroffen, da die Komplexe mit zwei- und dreiwertigem Eisen unterschiedliche Komplexstabilitäten besitzen. Durch Redoxreaktionen des Eisens kann daher die Stabilität der Komplexe verringert und somit ein Austausch erleichtert werden. Daher ist es bei allen Trennoperationen notwendig, besondere Aufmerksamkeit auf die Spezieserhaltung zu legen. Das heißt, relevante Parameter wie z.B. der pH-Wert müssen kontrolliert und stabil eingestellt werden. Außerdem ist eine Konzentrierung der Analyten sinnvoll, um eine sichere

Detektion zu ermöglichen. Durch die oben genannten Probleme sind Analysemethoden für nicht kovalent gebundene Metallkomplexe selten. Vor allem aber ist die Analytik nicht standardisiert und muss für jede Anwendung angepasst und maßgeschneidert werden.

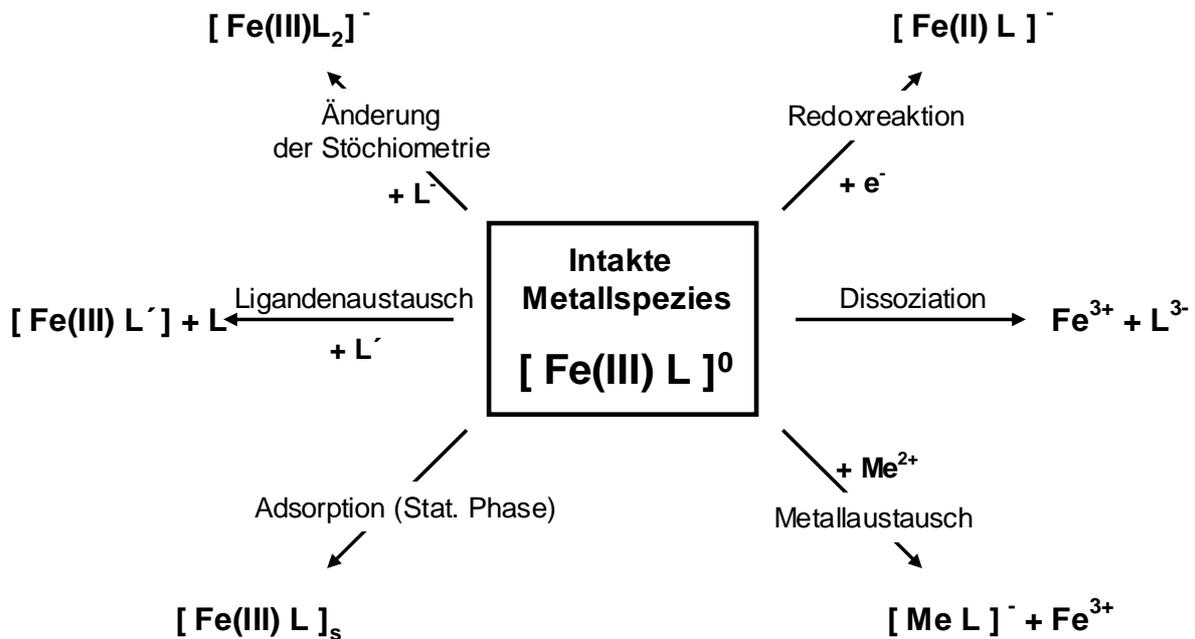


Abbildung 3: Probleme bei der Analyse nicht kovalenter Metallspezies (Bsp. Eisen)

2 Ziel der Arbeit

Um die existierende Lücke in der bisher vorhandenen Analytik zu schließen und das Wissen um mögliche Transportformen von Metallen zu vervollständigen, soll die vorliegende Arbeit neue analytische Methoden für die Speziesanalytik labiler Metallkomplexe in Pflanzen entwickeln. In der Anwendung auf konkrete biologische Fragestellungen soll der praktische Nutzen der Analysestrategien nachgewiesen werden.

Biologische Proben besitzen eine hohe Komplexität, wobei die Zielanalyten in geringen Konzentrationen vorhanden sind. Daher kann es notwendig sein, eine Vortrennung durchzuführen und die Analyten zu konzentrieren. Dabei muss die geringe Stabilität der nicht kovalenten Metallspezies beachtet werden. Es sollte daher eine Methode zur Konzentrierung intakter Metallspezies entwickelt werden, durch die die Analyten von der Matrix zu trennen sind. In weiteren Schritten soll die Kombinierbarkeit der Vortrennung mit verschiedenen Detektionsmethoden und nachgeschalteten Trennoperationen nachgewiesen werden. Die Trennung soll mit Hilfe von Standards entwickelt werden, anschließend soll die Anwendbarkeit für Originalproben bewiesen werden.

Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf der Trennung von kleinen Metallkomplexen, die thermodynamisch weniger stabil sind als die bisher untersuchten Phytosiderophor- und NA-Komplexe. Hierbei stehen Liganden wie Aminosäuren und Carbonsäuren im Vordergrund, die in den pflanzlichen Proben in großen Mengen auftreten. In biologischen Experimenten wurden vielfach Hinweise gefunden, die sehr stark auf eine Beteiligung von Citrat am Eisentransport hinweisen. Für den Kupfertransport ist Histidin ein möglicher Ligand. Diese zwei labilen Metall-Liganden-Systeme sollen näher untersucht werden. Mit HPLC-MS soll ein Analysenverfahren entwickelt werden, um die intakten Spezies zu trennen und zu identifizieren. Dieses Analysenverfahren soll mit Hilfe von Standards entwickelt werden. Es soll die Anwendbarkeit für reale Proben gezeigt und die Identität bzw. Stöchiometrie der Komplexe aufgeklärt werden.

Neben Kupfer-Histidin- und Eisen-Citrat-Komplexen sollen weitere Metabolite und Inhaltsstoffe erfasst werden, die direkt oder indirekt Einfluss auf den Metallhaushalt von Pflanzen haben können. In diesem Zusammenhang soll eine biologische Versuchsreihe analysiert werden, in deren Rahmen Gerstenpflanzen unter

unterschiedlichen Bedingungen ernährt wurden. Durch Induzierung von Seneszenz wurde eine Remobilisierung von Metallen aus seneszenten Pflanzenteilen hervorgerufen. Die verschiedenen Ernährungszustände sollen anhand ihrer Metall-Komplex- und Metabolit-Gehalte charakterisiert werden.

Die Analyse von metallhaltigen Proteinen und hochmolekularen Metalltransportern steht ausdrücklich nicht im Fokus dieser Arbeit. Die für diese Punkte notwendige Analytik unterscheidet sich grundlegend von der Analytik kleiner nicht-kovalenter Metallspezies. Ebenso stünde in diesem Fall ein anderer biologischer Ansatz im Mittelpunkt, der speziell bei membrangebundenen Metalltransportern (Transportproteine) zum Einsatz käme. Die Analyse der Stereochemie einzelner Analyten wird ebenfalls nicht betrachtet, da auch diese Analytik über die hier verwendeten Methoden hinausgeht.

3 Biologische Grundlagen

3.1 Faktoren in der Metallhomöostase von Pflanzen

Um die Versorgung von Pflanzen mit essenziellen Metallen zu gewährleisten und im Gleichgewicht zu halten, sind mehrere unterschiedliche Aspekte von Bedeutung. Zur Erleichterung der Metallaufnahme bei Mangelzuständen bedienen sich Pflanzen der Strategie, die Bioverfügbarkeit durch Veränderung der direkten Umgebung zu erhöhen. Hierfür existieren zwei Strategien. Bei Strategie-I-Pflanzen werden die Proton-ATPasen und Metallochelat-Reduktasen aktiviert, um die Löslichkeit von Eisen durch Absenken des pH-Wertes zu erhöhen und das gelöste Fe(III) zu Fe(II) zu reduzieren und aufzunehmen. Strategie-II-Pflanzen sondern Phytosiderophore ab, die Fe(III) binden, woraufhin die Komplexe durch die Pflanze aufgenommen werden. Innerhalb der Pflanze wird die Expression von Transportern hochreguliert und für die Verteilung der Metalle in der Pflanze werden Stoffwechselwege aktiviert, um Metallochaperone oder andere Liganden zur Verfügung zu stellen [24].

Bei Metallüberschuss wird durch Chelatbildung und Speicherung bzw. Kompartimentierung der gebundenen Metalle dem Überschuss in der Zelle entgegengewirkt. Als Antwort auf erhöhte Metallgehalte wird die Expression bzw. die Synthese von Phytochelatinen (Polypeptide aus Glutathion) aktiviert [38]. Auch Metallthioneine (kleine Proteine mit zahlreichen Cysteinyresten), die Metallgehalte in Menschen und Tieren regulieren, existieren in Pflanzen und scheinen eine Rolle in der Metallhomöostase zu spielen [38]. Um oxidativen Stress zu verhindern, wird überschüssiges Eisen durch Ferritin gebunden. Bei Ferritin handelt es sich um ein Protein, das hauptsächlich bei Menschen und Tieren als Eisenspeicher dient, aber auch in Pflanzen produziert wird, um Eisenüberschuss entgegen zu wirken [39].

Diese Vorgänge sind alle vom Transport der Metalle in die und durch die Pflanze abhängig.

Da die untersuchten Pflanzen in dieser Arbeit Strategie-II-Pflanzen sind, ist die Betrachtung von Transportern und Liganden weitestgehend auf die Zustände in diesen Pflanzen beschränkt. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die wichtigsten Transporter für Metalle in Strategie-II-Pflanzen und damit über mögliche Transportformen von Eisen (Kapitel 3.1.1). Die am besten bekannten Metall-Liganden sind die Phytosiderophore, die die Aufnahme von Eisen gewährleisten. Ihre Bildung und ihr Vorkommen werden in Kapitel 3.1.2 erläutert. Der Kenntnisstand zu

anderen (möglichen) Eisen-, bzw. Metall-Liganden ist in Kapitel 3.1.3 erläutert.

3.1.1 Metalltransporter

In dieser Arbeit geht es zwar darum, freie Liganden und Metallkomplexe zu untersuchen, trotzdem kann die Betrachtung von Transportern nicht völlig vernachlässigt werden, denn Kenntnis um das Vorhandensein von Transportern in bestimmten Pflanzenteilen lässt direkte Rückschlüsse darauf zu, welche Transportform in den jeweiligen Pflanzenteilen zu erwarten ist.

Die Aufnahme von Metall-Phytosiderophor-Komplexen in die Wurzel wird durch Yellow-Stripe-Transporter gewährleistet [40]. Diese werden durch Gene der YS1/YSL-Familie kodiert. Die YS1-Gene, wurden zuerst aus Mais isoliert [41]. In Gerste wurde ein HvYS1-Transporter identifiziert, ein YS1-Homolog, das Fe(III)-PS-Komplexe transportiert [40, 42]. HvYS1 wird durch Eisenmangel induziert und ist in den Epidermiszellen der Wurzel lokalisiert, was auf die Rolle in der Eisenaufnahme schließen lässt [40]. In Reis wurden 18 verschiedene YS1-ähnliche Gene identifiziert (OsYSL 1-18), von denen OsYSL15 unter Eisenmangel stark hochreguliert wird [43]. Reispflanzen besitzen weitere Gene, die für die Eisenaufnahme zuständig sind. Bei OsIRT1 und OsIRT2 handelt es sich, obwohl Reis eine Strategie-II-Pflanze ist, um die Homologen zu IRT1, das in Arabidopsis isoliert wurde und dort für den Transport von Fe(II) in die Pflanze zuständig ist [44]. OsIRT1-Expression wird durch Eisenmangel induziert, sowohl in der Wurzel als auch im Stängel [44]. Damit ist Reis, anders als andere Strategie-II-Pflanzen, in der Lage, Fe(II) und Fe(III) aufzunehmen. Die IRT-Transporter gehören der ZIP-Transporterfamilie an (zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter-like protein), die in Strategie-I- und Strategie-II-Pflanzen vorkommt und neben Eisen auch andere zweiwertige Metalle, wie Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} transportiert [45].

Auch der innerpflanzliche Transport ist Transporter-basiert. So wurde beispielsweise aus den OsYSL-Genen OsYSL2 identifiziert, das den Transport von Fe(II)-NA und Mn(II)-NA ermöglicht. OsYSL2 wird in der Wurzel, wie auch in Blättern exprimiert [46]. Neben NA wurden auch PS in Stängeln von Gramineen gefunden, deren Gehalt unter Eisenmangel stark anstieg [47], so dass eine Beteiligung von PSen an der innerpflanzlichen Verteilung anzunehmen ist. OsYSL18-Expression wurde in Verbindung mit dem Phloem gefunden, was zur Vermutung führte, dass OYSL18 eine Rolle im Transport von Fe(III)-DMA ins Phloem spielt [40].

Der Transport von Citrat (als Eisenligand) ins Xylem wird von Efflux-Transportern ermöglicht. Aus der MATE- (multidrug and toxin efflux)-Familie ist FRD3 (Ferric reductase defective 3) in Arabidopsis identifiziert worden [48]. Homologe FRD3-like-Gene (OsFRDL1), die Citrat-Efflux-Transporter exprimieren, wurden auch in Reis identifiziert [49-50]. Für den Transport von Eisen ins Xylem ist AtIREG1 (Arabidopsis iron-regulated 1) ein vielversprechender Kandidat [45, 51].

Für IRT-Transporter ist es bekannt, dass sie eine geringe Substratspezifität besitzen. Ackerschmalwand zeigt unter Eisenmangelzuständen eine durch den Mangel bedingte erhöhte Aufnahme anderer Metallkationen [7]. Auch für Hefen zeigen Studien, dass dieser Transporter nur mäßig substratspezifisch ist und neben Eisen(II) auch andere zweiwertige Ionen wie z.B. Mn^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} transportiert [8]. In Strategie-II-Pflanzen wird über die YSL- (yellow stripe like)-Transporter auch Kupfer als Phytosiderophorkomplex aufgenommen.

Kupfer wird mithilfe von COPT-Transportern in die Wurzel aufgenommen [52]. COPT-Transporter gehören zur Ctr-Familie [52-54]. In Arabidopsis wurden fünf COPT-Transporter identifiziert [54]. COPT1 wird vor allem in der Wurzel exprimiert und daher der Kupfer-Aufnahme zugeschrieben, während COPT2 in Stängeln lokalisiert ist. COPT 3 und 5 sind wahrscheinlich für die intrazelluläre Mobilisierung zuständig [52]. Für den innerpflanzlichen Kupfertransport konnten P-type heavy metal ATPasen identifiziert werden, die zu den p-type ATPasen gehören, die unter ATP-Aufwendung Metallkationen transportieren [54]. Die ATPase HMA5 wurde in der Wurzel von Arabidopsis identifiziert und dem Kupfer-Transport aus den Zellen zugeordnet [53]. Die intrazelluläre Verteilung von Kupfer wird durch Kupfer-Chaperone gewährleistet, die zur Familie der Metallochaperonen gehören [54]. Kupfer-Chaperone transportieren Kupfer zu intrazellulären Kompartimenten. In Pflanzen wurden drei verschiedene Kupfer-Chaperone identifiziert, CCH, COX17 und CCS [54]. In Arabidopsis ist bekannt, dass die Expression von CCH während der Seneszenz hochreguliert ist, was darauf schließen lässt, dass CCH an der Mobilisierung von Kupfer beteiligt ist [52].

Hauptsächlich in Reis wurden drei homologe Gene zu einer weiteren Transporter-Familie, der N-ramp-Familie identifiziert. NRAMP-Proteine werden aus Hefe-Studien als Transporter für zweiwertige Kationen eingeordnet [54].

3.1.2 Phytosiderophore als Liganden für den Metalltransport

Nicotianamin (NA) ist eine nicht proteinogene Aminosäure und wird mit Hilfe der Nicotianamin-Synthase aus drei Molekülen S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) hergestellt [10, 47, 55]. Eine Übersicht über die Biosynthese der wichtigsten Phytosiderophore findet sich in Abbildung 1 (s. Kap.1.2). Die wichtigsten aus NA gebildeten Phytosiderophore aus der Mugineinsäurefamilie sind 2'-Deoxymugineinsäure (DMA), Mugineinsäure (MA), 3-Hydroxymugineinsäure (HMA) und 3-epi-Hydroxymugineinsäure (epi-HMA). Sie unterscheiden sich durch zunehmende Hydroxylierung und durch ihre Komplexstabilitäten. Die Strukturformeln sind in Abbildung 2 dargestellt. Das Phytosiderophorenmuster in verschiedenen Pflanzenspezies und Cultivaren ist stark unterschiedlich [14]. In Weizen (*Triticum aestivum*) wurde in verschiedenen Cultivaren nur 2-Deoxymugineinsäure nachgewiesen, wohingegen in Gerste (*Hordeum*) je nach Sorte unterschiedliche Phytosiderophore nachgewiesen werden konnten. Neben DMA wurden in einigen Spezies auch epi-HMA und/oder MA gefunden. Roggen (*Secale*) produziert DMA, MA und HMA [56].

In Gerste (*Hordeum vulgare*) wurden Nicotianaminsynthase-Gene identifiziert, die die Hydroxylierung von NA und damit die Biosynthese von weiteren Phytosiderophoren der MA-Familie kodieren [47, 55, 57]. Zwei Gene aus Gerste sind für die Produktion von Nicotianamin-aminotransferase (NAAT) verantwortlich, deren Transkription durch Eisenmangel verstärkt wird [9].

Um die Bedeutung der Phytosiderophore für die pflanzliche Fe-Aneignung und Ertragsleistung zu zeigen, wurde die Phytosiderophor-Synthese über biotechnologische Ansätze verändert. Die zwei NAAT-Gene aus Gerste [9] wurden in Reispflanzen (*Oryza sativa*) eingebracht, und so wurde in einer anderen Poaceen-Gattung die Produktion von Phytosiderophoren unter Eisenmangel erhöht. Dadurch wurden die Eisenaufnahme und somit auch die Erträge von Reispflanzen unter Eisenmangel erheblich gesteigert [10].

Unklar ist bisher die Funktion der vielen unterschiedlichen Phytosiderophorspezies.

3.1.3 Andere Liganden für den Metalltransport

NA spielt im Rahmen des Metalltransportes nicht nur als Vorstufe der PS eine Rolle, sondern kann innerhalb der Pflanze auch als eigenständiger Ligand fungieren. NA

kommt in allen Pflanzen vor und ist einer der sowohl in Strategie-I- als auch in Strategie-II-Pflanzen bekannten Metallliganden. Studien an der Tomatenmutante Chloronerva zeigen die Bedeutung von NA im intrazellulären Metalltransport. Diese Mutante kann kein NA synthetisieren und zeigt trotz ausreichender und z. T. erhöhter Eisenkonzentrationen in ihren Blättern starke Eisenmangelercheinungen. Eine Zugabe von NA behebt die Mangelercheinungen [58]. Die Überexpression von NAA zur Phytosiderophor-Produktion in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) führte zu Mangelercheinungen aufgrund des Verbrauchs endogenen NAs [59]. Die Bedeutung von NA wurde von Curie et al. zusammengefasst [60]. In den Chloronerva- und Tabak-Studien wird die Bedeutung von NA deutlich, gleichzeitig wurde auch gezeigt, dass NA nicht der einzige Transportligand für Metalle sein kann [60].

Für den Eisentransport innerhalb der Pflanze zeigten weitere Arbeiten [28-29], dass Eisen-NA-Komplexe zwar bei einem höherem pH-Wert von ca. 7,5, wie er im Phloem vorliegt, stabil sind, bei einem pH-Wert von 5,5 wie im Xylem jedoch die Bindung von Eisen an Citrat stärker und somit dominierend sein sollte. Der direkte Austausch von NA gegen Citrat unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden [28].

Neben NA ist Citrat einer der vielversprechendsten Liganden für den Eisentransport innerhalb der Pflanze, besonders bei niedrigem pH Wert wie er z.B. im Xylem vorliegt (Abbildung 2, Kap. 1.2) [28-29]. Es gibt schon seit vielen Jahren in biologischen Untersuchungen verstärkt Hinweise, die auf einen citratbasierten Eisentransport in Pflanzen schließen lassen. In unterschiedlichen Studien konnten Zusammenhänge zwischen erhöhten Eisengehalten und erhöhten Citratgehalten festgestellt werden. Bei Untersuchungen von Soja (*Glycine max*) und Tomate (*Lycopersicum esculentum*) zeigte sich, dass die aus der Wurzel in den Stamm transportierte Eisenmenge mit der transportierten Citratmenge korreliert [30-31]. Ebenso konnte man eine Korrelation zwischen unterschiedlich hohen Citratkonzentrationen und verschiedenen Eisernährzuständen der Pflanze feststellen. Andere Studien untersuchten den Gehalt an organischen Säuren von unter Eisenmangel gewachsenen Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) und Birnen (*Pyrus communis*) im Vergleich zu normal ernährten. Dabei wurde bei beiden Pflanzenarten unter Eisenmangel eine Erhöhung der Gesamtmenge an organischen Säuren in der Apoplastenflüssigkeit und im Xylemsaft festgestellt. Bei den Zuckerrüben handelte es sich dabei hauptsächlich um Citrat und Malat, bei den Birnen wurden Citrat, Malat und Ascorbat als Hauptsäuren festgestellt

[32-33].

Neben der offensichtlichen Korrelation von Citrat und anderen organischen Säuren mit Eisen in verschiedenen Pflanzengattungen konnte die Existenz von Eisen-Citrat-Transportern nachgewiesen werden. In Bakterien konnte ein Fe(III)-Citrat-Transporter aus der CitMHS-Familie nachgewiesen werden [61]. In *Escherichia coli* existiert ein Eisen-Citrat-Komplex mit 2:2-Stöchiometrie, der eine Rolle im citratvermittelten Eisentransport spielt [62].

Nebem den Erkenntnissen zum Transport von Eisen liegen auch für andere Metalle entsprechende Daten aus biologischen Studien vor. So wird Kupfer, wie auch Eisen, hauptsächlich in komplexierter Form durch die Pflanze transportiert.

Der Transport von Kupfer wird in der Pflanze hauptsächlich mit Hilfe von Peptid- bzw. Proteinstrukturen ermöglicht. Für den Transport von Kupfer durch die Pflanze dienen Metallochaperone, „Proteinbegleiter“, die die Faltung von neuen Proteinen ermöglichen. Sie können das Kupfer binden und transportieren es zum Zielprotein [63]. In *Arabidopsis* wurde dafür das ATX1-artige Chaperon CCH identifiziert [52]. Außerdem existieren noch ca. 50 ATX1-artige Proteine, die mit den Cu-transportierenden ATPasen interagieren (z.B. RAN1, HMA5) [24].

In biologischen Studien wurden auch Zusammenhänge zwischen Kupfergehalt und den Mengen an kleinen Verbindungen, wie z.B. Aminosäuren, festgestellt. Im Xylemsaft von Chicoree (*Cichorium intybus*) liegen 99,74 % und in dem von Tomaten (*Solanum lycopersicum*) 99,68 % des enthaltenen Kupfers als Komplex vor [64-65]. Die Liganden wurden dabei nicht identifiziert. Es besteht aber ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung des Gehaltes an Kupfer in der Pflanze und einer Veränderung des Aminosäuregehaltes. Im Tomaten-Xylem wurden, zusammen mit einem erhöhten Kupfergehalt, erhöhte Gehalte von Glutamin, Histidin und Nicotianamin gefunden, in Chicoree hauptsächlich von Glutaminsäure, Histidin und Nicotianamin [64]. In abessinischem Kohl (*Brassica carinata*) korreliert der Gehalt an Aminosäuren mit der Kupferaufnahme. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Pflanzen mit einem hohen Kupfergehalt auch der Histidin- und Prolingehalt anstieg, während in Kupfermangelzuständen vermehrt Nicotianamin gebildet wurde [66].

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Aminosäuren wie z.B. Histidin, Glutamin u. a. bei der Verteilung von Kupfer in der Pflanze eine Rolle spielen. Obwohl die Hinweise auf eine Beteiligung von Aminosäuren am innerpflanzlichen Transport von

Kupfer in verschiedenen Arbeiten bestätigt wurden, fehlen genauere Untersuchungen zur Trennung und Identifizierung von Kupfer-Aminosäure-Spezies.

3.2 Biologische Versuchsplanung

Die biologische Planung, die Anzucht der Pflanzen, die Probennahme bis hin zur Extraktion erfolgten durch einen Kooperationspartner, die Arbeitsgruppe Molekulare Pflanzenernährung in der Abteilung Physiologie und Zellbiologie am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben, unter der Leitung von Prof. Dr. N. von Wirén und wurden nicht am ISAS durchgeführt. Um das Verständnis der Unterschiede der untersuchten Proben zu ermöglichen, wurde die Probenerzeugung im Folgenden erläutert.

Die in dieser Arbeit verwendete Probenreihe gehört zu einer Studie über Seneszenz und die damit verbundene Metall-Remobilisierung aus den seneszenten Blättern von Gerstenpflanzen. Bei Seneszenz handelt es sich um einen Alterungsprozess, der auf einzelne Pflanzenorgane beschränkt sein kann. Im frühen Stadium der Chlorose ist Seneszenz umkehrbar; es existieren verschiedene Auslöser für Seneszenz. Es ist bekannt, dass Metalle aus seneszenten Blättern remobilisiert werden können, der Mechanismus hierbei ist jedoch weitgehend unbekannt. Die Transportspezies unterscheiden sich von den in Blättern vorliegenden, somit sollte die Art und Menge der Metallspezies sich in seneszenten Blättern von anderen unterscheiden.

Ziel der Analysen war die Untersuchung der an der Verlagerung von Metallen beteiligten Metallspezies in Pflanzen mit unterschiedlichen Ernährungszuständen. Es wurde bei einem Teil der Pflanzen Seneszenz ausgelöst, um festzustellen, ob diese sich auf analytischem Wege von den Vergleichspflanzen unterscheiden lassen. Im Fokus der Untersuchungen standen Unterschiede in der Verteilung von bekannten Metallkomplexen und anderen Metaboliten, ebenso wie ggf. vorhandene „neue“ Metallspezies.

In der biologischen Planung wurden zwei unterschiedliche Auslöser für Seneszenz in Gerstenpflanzen verwendet. Der erste Seneszenzauslöser ist Stickstoffmangel (verwendet in Experiment 2). Stickstoff greift auf verschiedenen Wegen in den Transport bzw. in die Remobilisierung von Nährstoffen ein. Zum einen fördert er als Baustein von PSen und NA die Bereitstellung von Eisen, andererseits führt ein hoher

Stickstoffgehalt in der Pflanze zu stärkerer Einbindung von Eisen, bzw. Metallen in Proteine, was eine Verringerung der Verfügbarkeit für die Remobilisierung zur Folge haben kann. Um festzustellen, in welcher Form sich der Stickstoffmangel auf die Remobilisierung von Eisen auswirkt, wurde in einem zweiten Teil der Experimente die Seneszenz durch Beschattung ausgelöst (verwendet in Experiment 3). Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Remobilisierung von Eisen aus den Wurzeln zu verhindern, wurden die Pflanzen in einem „split-root-System“ gezogen, in dem der ehemals eisenaufnehmende Wurzelteil abgetrennt wird.

Gerste (Henni)

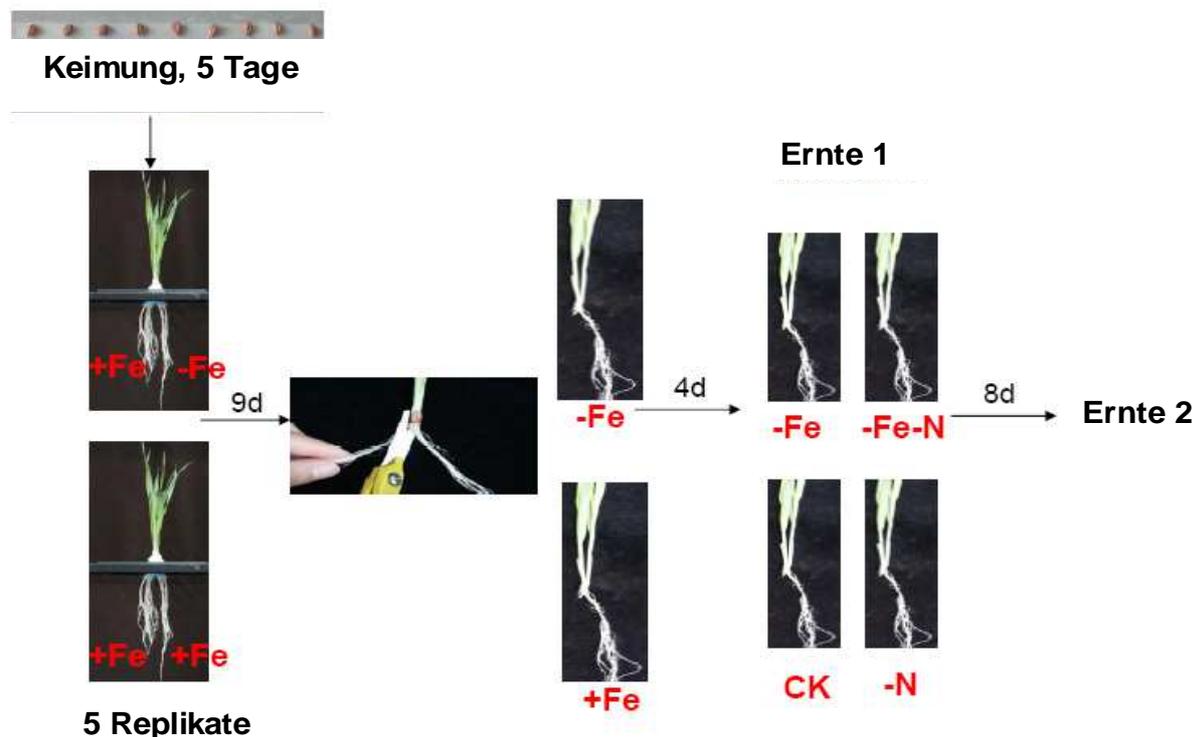


Abbildung 4: Aufbau von Experiment 2: Die Wurzeln der 5 Tage alten Pflanzen wurden in zwei Hälften geteilt und getrennt mit Nährstoffen versorgt („split-root-System“). Nach 9 Tagen wurden die eisenaufnehmenden Wurzelhälften (bzw. eine der eisenaufnehmenden Hälften) gekappt (-Fe, +Fe). Nach 13 Tagen erfolgte die erste Ernte, bei den restlichen Pflanzen wurde jeweils in der Hälfte der Gruppe Seneszenz durch Stickstoffmangel ausgelöst (-Fe-N, -N). Die zweite Hälfte diente als Kontrollgruppe (-Fe, CK). 8 Tage später erfolgte die zweite Ernte. Dabei wurden jeweils die einzelnen Pflanzenteile getrennt geerntet (untersucht wurden ältestes Blatt OL, zweitältestes Blatt SOL).

Die untersuchten Gerstepflanzen wuchsen unter kontrollierter Nährstoffversorgung in hydroponischen Kulturen. Die verwendeten Gerstenkörner keimten 5 Tage lang. Danach wurden die vorhandenen Wurzeln in zwei gleich große Büschel geteilt („split-root-System“) und in verschiedene Nährlösungen getaucht. Dargestellt sind dieses System und das Versuchskonzept in den Abbildungen 4 und 5.

Gerste (Henni)

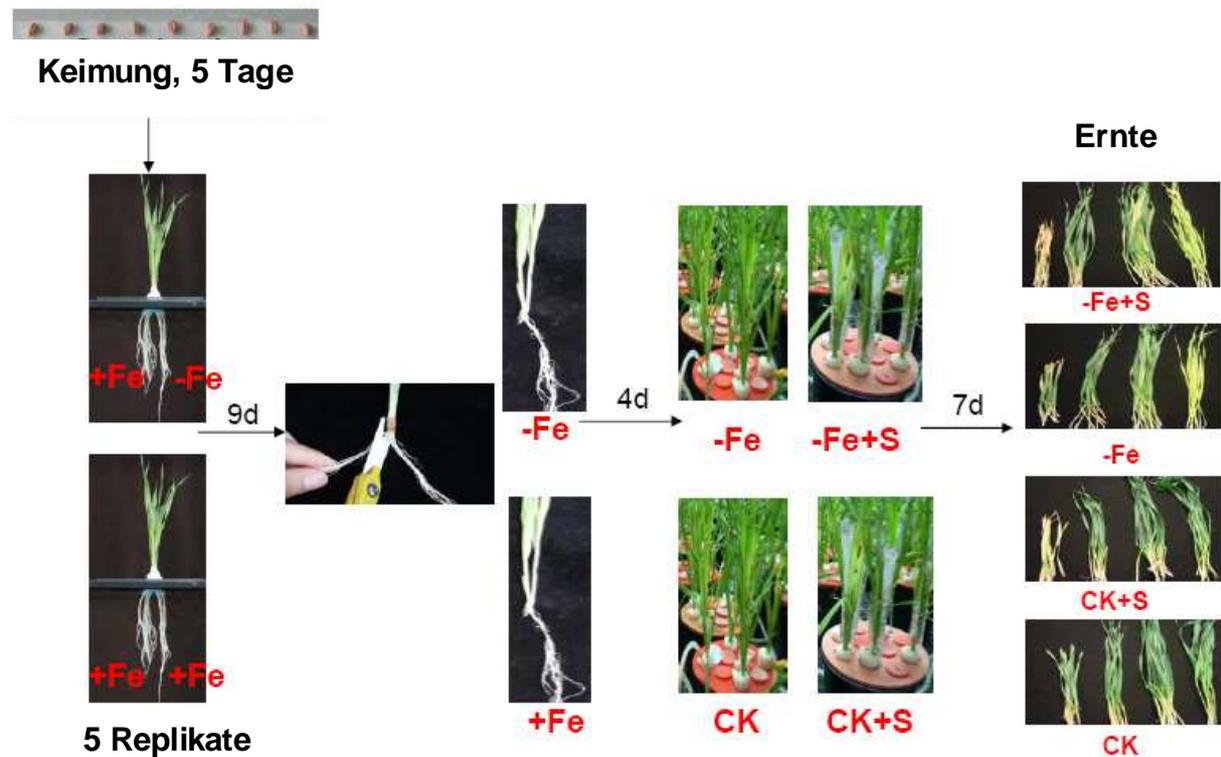


Abbildung 5: Aufbau von Experiment 3: Die Wurzeln der 5 Tage alten Pflanzen wurden in zwei Hälften geteilt und getrennt mit Nährstoffen versorgt („split-root-System“). Nach 9 Tagen wurden die Eisen-führenden Wurzelhälften (bzw. eine der Eisen-führenden Hälften) gekappt (-Fe, +Fe). Nach 13 Tagen wurde jeweils bei der Hälfte der Gruppe das älteste Blatt beschattet und dadurch Seneszenz ausgelöst (-Fe+S, CK+S). Die zweite Hälfte diente als Kontrollgruppe (-Fe, CK). 7 Tage später erfolgte die Ernte. Dabei wurden jeweils die einzelnen Pflanzenteile getrennt geerntet (untersucht wurden ältestes Blatt OL, zweitältestes Blatt SOL).

Bei den Pflanzen, die später einem Eisenmangel ausgesetzt werden sollten, wurde die Pflanze nur über eine Hälfte der Wurzel mit Eisen aus der Nährlösung versorgt. Die andere Seite wurde eisenfrei gehalten. Die Pflanzen, die im späteren Experiment keinem Eisenmangel ausgesetzt werden sollten, wurden auf beiden Seiten mit eisenhaltiger Nährlösung versorgt. Danach wuchsen die Pflanzen 9 Tage lang mit

diesem geteilten Wurzelsystem heran, bevor bei allen Pflanzen je eine Wurzelhälfte gekappt wurde. Bei den späteren Eisenmangel-Pflanzen wurde die Eisen führende Seite gekappt. Vier Tage nach Entfernung der Hälfte der Wurzeln wurde in allen Versuchen die Seneszenz eingeleitet. In der einen Gruppe wurde dazu durch Stickstoffentzug in der Nährlösung (-N) ein Stickstoffmangel hervorgerufen (E2). Bei diesen Pflanzen wurde auch zu diesem Zeitpunkt die erste Ernte durchgeführt (h1). In der zweiten Gruppe (E3) wurde die Seneszenz durch Beschattung des ältesten Blattes (durch Umwickeln mit Aluminiumfolie) ausgelöst (S). Die Ernte erfolgte dann bei Beschattung nach weiteren 7 Tagen, die Ernte bei Stickstoffmangel nach weiteren 8 Tagen. Bei beiden parallel geführten Experimenten wurden das älteste (OL) und das zweitälteste (SOL) Blatt untersucht. Es wurden jeweils 5 Replikate (5 Pflanzen pro Zustand) erzeugt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Experimente.

3 Biologische Grundlagen

Tabelle 1: Experimentplanung für Gerstepflanzen, unterschiedliche Ernährungszustände (CK: normaler Ernährungszustand; -Fe+S: Eisendefizit abgeschattet; CK+S: normal ernährt, abgeschattet; -Fe: Eisenmangel; -N: Stickstoffmangel), verschiedene Experimente (Seneszenz ausgelöst durch Stickstoffmangel (E2) und Abschattung (E3)), Ernten (h – Ernte E3, h1 – erste Ernte E2, h2 – zweite Ernte E2) geerntete Pflanzenteile (SOL – zweitältestes Blatt (second-oldest leaf); OL – ältestes Blatt (oldest leaf); es wurden jeweils 5 Replikate erzeugt

Probenbezeichnung (Ernte, Experiment, Blattteil)	Probe (Ernährungszustand)	Nummer
h1 E2 OL	-Fe1	1 - 5
	CK1	6 - 10
h1 E2 SOL	-Fe1	11 - 15
	CK1	16 - 20
h2 E2 SOL	-Fe-N1	21 - 25
	-Fe1	26 - 30
	-N1	31 - 35
	CK1	36 - 40
h E3 SOL	-Fe+S1	41 - 45
	-Fe1	46 - 50
	CK+S1	51 - 55
	CK1	56 - 60
h2 E2 OL	-Fe-N1	61 - 65
	-Fe1	66 - 70
	-N1	71 - 75
	CK1	76 - 80
h E3 OL	-Fe+S1	81 - 85
	-Fe1	86 - 90
	CK+S1	91 - 95
	CK1	96 - 100
	Blank	ddH ₂ O

4 Methodische Grundlagen

Der Gesamtmetallgehalt von Proben ist häufig nicht aussagekräftig, beispielsweise bei der toxikologischen Bewertung bestimmter Proben im Hinblick auf ihren Schwermetallgehalt. Vielmehr ist diese Einordnung abhängig von der Bioverfügbarkeit der Schwermetalle und ihrer Wirkung, die maßgeblich von der Oxidationsstufe des Metalls und/oder seiner Bindungsform abhängt. Ein klassisches Beispiel für den Einfluss von Oxidationsstufen ist das Chrom. Das Cr-(III) ist ein essentielles Spurenelement, während das Cr-(VI) toxisch ist. Der Einfluss der Bindungsform lässt sich sehr gut am Vergleich von Quecksilber und Arsen erkennen. Während die Toxizität von Hg-(II) gering ist, ist Methylquecksilber extrem giftig. Arsen dagegen ist als As-(III) und As-(V) giftig, während die organische Bindungsform Arsenobetain nur eine geringe Toxizität aufweist. Die toxikologische Beurteilung bzw. Gefährdungsbeurteilung in den Bereichen Umwelt- und Lebensmittelanalytik war der Ausgangspunkt für die Entwicklung der Speziesanalytik. Einen breiten Überblick über den Stand der Technik in der Speziesanalyse allgemein und das bisherige Wissen über die Spezies verschiedener Elemente bieten die Werke von Heumann et al. [Handbook of Elemental Speciation I + II, 2003, 2005] und Ure et al. (Chemical Speciation in the Environment, 1995).

Die starke Weiterentwicklung im Bereich Speziesanalytik in den letzten Jahren und Jahrzehnten wurde auch durch die Fortschritte der analytischen Methoden gefördert, da die Analyse der einzelnen, gering konzentrierten Spezies auf Methoden mit sehr niedrigen Detektionsgrenzen angewiesen ist. So hat erst die Entwicklung leistungsfähiger LC-MS-Kopplungen die Möglichkeit geschaffen, die molekulare Identität von Metallspezies in komplexen Proben aufzuklären. Diese Technik bildet in Form von LC-ESI-MS auch eine wichtige Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Aufgabe der Speziesanalytik ist es, die unterschiedlichen Arten, in denen ein bestimmtes Element vorliegt, zu analysieren. Es wird untersucht, in welcher Verbindung und Oxidationsstufe das Element anzutreffen ist. Im Fall der Metallkomplexe spielen vor allem unterschiedliche Stöchiometrien der Komplexe eine Rolle, aber auch unterschiedliche Ladungszustände der gesamten Komplexe oder der gebundenen Metalle. Dabei existieren sowohl direkte Methoden (ohne Vortrennung) als auch Methoden mit Vortrennung. Die direkten Methoden stellen dabei den Idealfall dar, da sie eine Analyse der Spezies direkt aus der Matrix

ermöglichen. Da jedoch die Matrix gerade bei Pflanzenproben sehr komplex ist und nur eine geringe Analytkonzentration aufweist, ist die Nachweisgrenze in den meisten Fällen nicht ausreichend für eine Analyse. Optimierte Analyseverfahren, die Trennung, Konzentrierung und Fraktionierung beinhalten, sind im Gegensatz dazu in der Regel sehr nachweisstark. Sie haben aber den Nachteil, dass sie immer in die Speziesgleichgewichte eingreifen. Dabei besteht die Gefahr, dass die Änderung der chemischen Umgebung zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der Spezies führt.

Um dies zu verhindern, muss bei der Auswahl der Analysemethoden die Spezieserhaltung im Vordergrund stehen. Nur wenn sichergestellt ist, dass die Metallkomplexe während der Analyse stabil sind, d. h. keiner unkontrollierten Änderung unterliegen, kann man verlässliche Aussagen über die Identität der Komplexe und die Spezieszusammensetzung in der Probe machen. Da die Stabilität der zu analysierenden Komplexe in der Regel nicht bekannt ist, ist es notwendig, die Methoden unter diesem Aspekt sorgfältig zu prüfen. Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Methoden wurden entsprechend dieser Bedingungen gewählt und weiterentwickelt.

4.1 Elektrophoretische Trennverfahren

Elektrophoretisch basierte Trennverfahren separieren Substanzen innerhalb eines elektrischen Feldes. Die zu trennenden Substanzen befinden sich dabei zwischen den Elektroden, an denen eine Spannung im Kilovolt-Bereich anliegt. Durch das entstehende elektrische Feld werden die geladenen Moleküle beschleunigt. Allgemein wird die Kraft, die das Molekül erfährt, durch die Anzahl der Ladungen und die Stärke des elektrischen Feldes bestimmt.

$$\vec{F} = z * e * \vec{E}$$

Formel 1: \vec{F} = Kraft, die auf das Molekül wirkt; z = Anzahl der Elementarladungen im Molekül; e = Elementarladung; \vec{E} = elektrisches Feld

Dieser Kraft entgegengesetzt ist die Reibung, die das bewegte Molekül erfährt. Diese Reibung ist bestimmt durch den Teilchenradius, die Geschwindigkeit des Teilchens und die Viskosität des Mediums, die im Stokes'schen Gesetz zusammengefasst werden.

$$\vec{f} = 6 * \pi * \eta * r * v$$

Formel 2: \vec{f} = Reibungskraft; η = Viskosität des Mediums; r = Teilchenradius; v = Partikelgeschwindigkeit

Im homogenen elektrischen Feld werden die Teilchen beschleunigt, bis sich ein Gleichgewicht einstellt und daraus eine konstante Migrationsgeschwindigkeit v resultiert. Nach der Gleichgewichtseinstellung entspricht also die beschleunigende Kraft der Stokes'schen Reibung.

$$v = \frac{F}{\vec{f}} = konst.$$

Formel 3: v = Migrationsgeschwindigkeit

Die Migrationsgeschwindigkeit ist proportional zur Stärke des elektrischen Feldes. Der resultierende Proportionalitätsfaktor ist die elektroforetische Mobilität μ , die sich folgendermaßen berechnen lässt:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{z * e}{6 * \pi * \eta * r}$$

Formel 4: Elektroforetische Mobilität μ

Bei den dieser Ableitung zu Grunde liegenden theoretischen Annahmen sind einige Faktoren nicht berücksichtigt, die unter realen Bedingungen eine Rolle spielen. Das Stokes'sche Gesetz geht von kugelförmigen Teilchen aus, was bei realen Molekülen nicht gegeben ist. Zudem ist ein geladenes Molekül immer von einer Hydrathülle umgeben, die seinen Radius vergrößert und seine effektive Ladung verringert. Es wird von einer Gegenionenwolke umgeben, die durch das elektrische Feld verzerrt werden kann (elektroforetische Relaxation). Diese Faktoren bewirken, dass die effektive Ladung eines Moleküls nicht exakt der formalen Ladung entspricht und die Mobilität nicht exakt zu berechnen ist.

Das anliegende elektrische Feld erzeugt einen Stromfluss, der von der spezifischen Leitfähigkeit des Puffers und dem Kapillarendurchmesser abhängt.

$$I = U * \kappa * \frac{d^2 * \pi}{4 * L_{ges}}$$

Formel 5: I = Stromstärke; U = Spannung; κ = Leitfähigkeit; d = Kapillareninnendurchmesser; L_{ges} = Gesamtlänge der Kapillare

$$P = U * I = U^2 * \kappa * \frac{d^2 * \pi}{4 * L_{ges}}$$

Formel 6: P = elektrische Leistung

Die resultierende elektrische Leistung wird teilweise in Joule'sche Wärme umgesetzt. Diese Joulesche Wärme führt zu vermehrter Diffusion, bedingt dadurch eine Bandenverbreiterung, und muss deshalb minimiert werden. Die Trennung wird daher in Kapillaren mit kleinem Durchmesser durchgeführt, um eine effiziente Ableitung der Wärme über die Kapillarwand zu ermöglichen.

4.1.1 Trennung von Metallspezies mit IEF

Bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) handelt es sich um ein elektrophoretisches Trennverfahren. Die Analyten müssen, um fokussiert zu werden, einen amphoteren Charakter besitzen, d. h. sie müssen geladen sein und, je nach Umgebungs-pH-Wert, sowohl als Säure als auch als Base reagieren können. Die amphoteren Moleküle werden in einem elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten aufgetrennt. Sie müssen an einem pH-Wert innerhalb des verwendeten pH-Gradienten die Nettoladung null besitzen, was dem isoelektrischen Punkt pI des Moleküls entspricht. Der pH-Gradient wird mit Hilfe von Carrier-Ampholyten (CA) in der Lösung aufgebaut. Bei Carrier-Ampholyten handelt es sich um ein Gemisch aus synthetischen Molekülen mit sauren und basischen Gruppen, die in einem bestimmten pH-Bereich fokussieren und diesen puffern, so dass ein stabiler pH-Gradient innerhalb der Lösung entsteht.

Während der Fokussierung im elektrischen Feld werden die geladenen Moleküle, je nach Ladung, zur Anode oder zur Kathode bewegt.

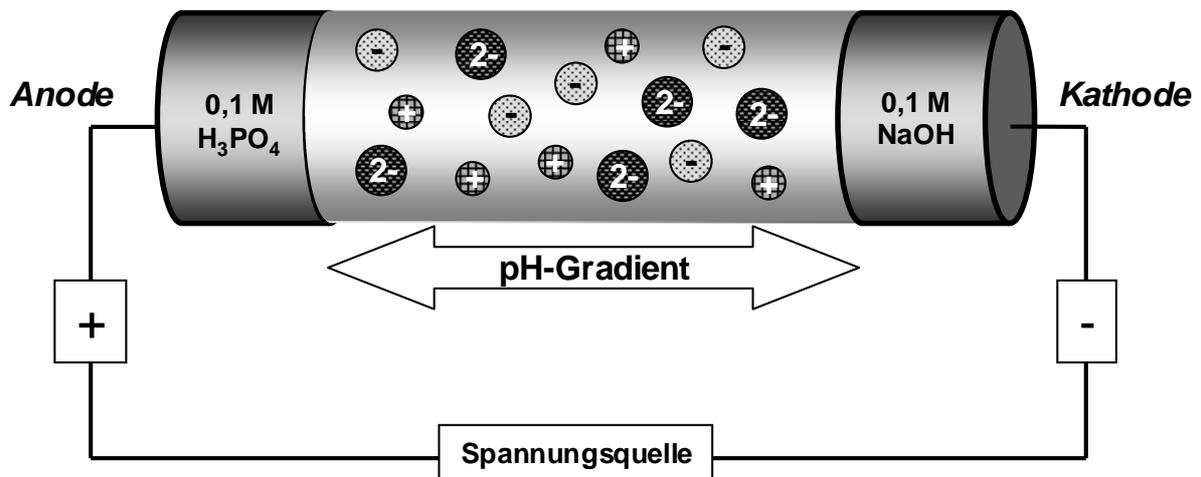


Abbildung 6: Schematischer Aufbau bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) in wässriger Lösung, Anschluss der Trennkammer; Trennung von drei unterschiedlichen Analytmolekülen (gepunktet, kariert, schraffiert)

Während der Wanderung durch den pH-Gradienten ändert sich die Nettoladung des Moleküls bis zum Erreichen des pI . Ist die Gesamtladung Null wandert das Molekül im elektrischen Feld nicht mehr weiter. An der Stelle, an der der pH-Wert dem pI entspricht, werden alle gleichartigen Moleküle fokussiert, was eine Konzentrierung der Analyten zur Folge hat. Außerdem werden auf diese Weise andere geladene Bestandteile der Matrix abgetrennt, weil sie entweder in anderen pH-Bereichen fokussieren oder zur Anode oder Kathode migrieren. Da die gesamte Trennkammer mit der Probenlösung gefüllt wird, werden die Analyten durch die Fokussierung in scharfe Banden konzentriert. Nur ungeladene Bestandteile bleiben weiterhin in der gesamten Probe gleichmäßig verteilt.

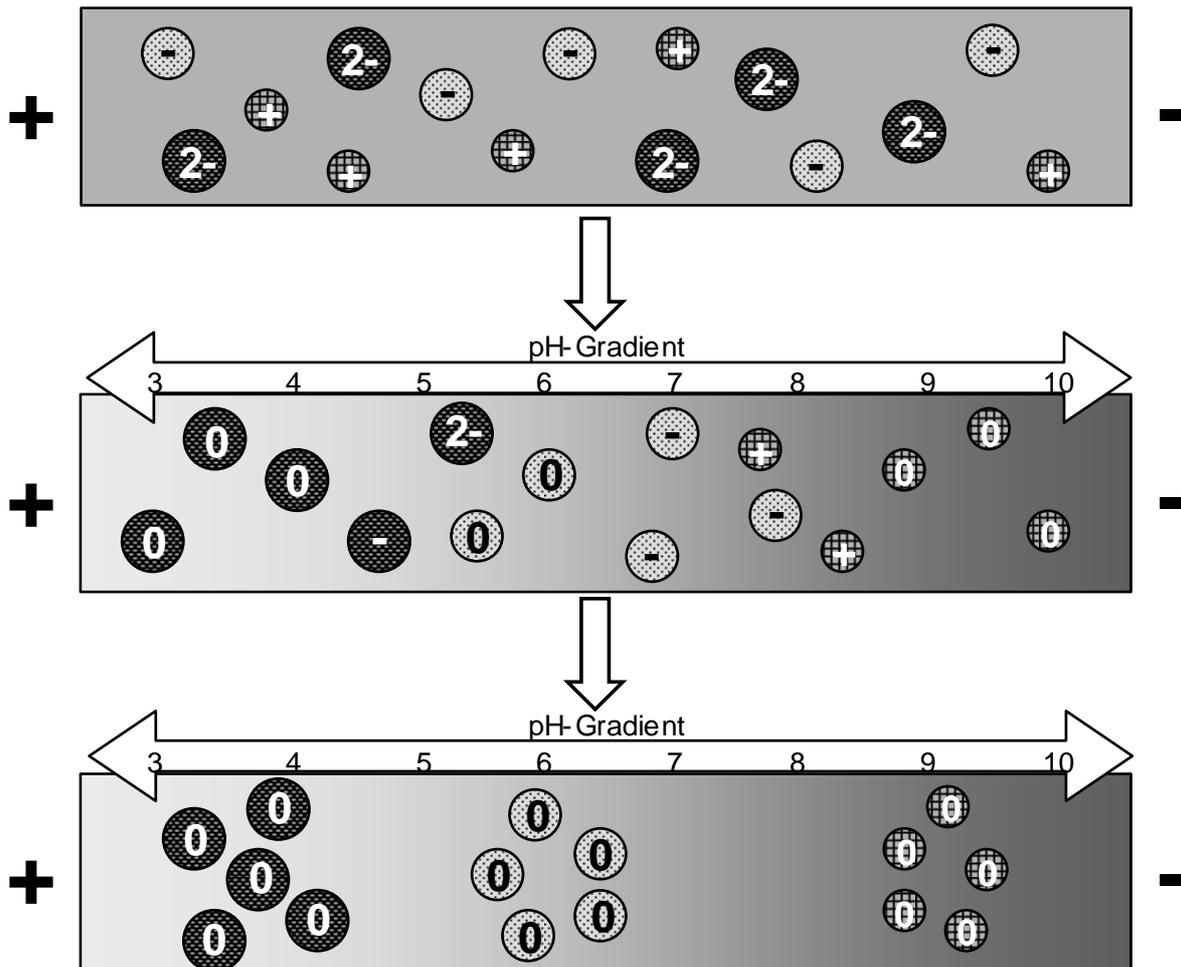


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufes einer Fokussierung in wässriger Lösung; Trennung von drei unterschiedlichen Analytmolekülen (gepunktet, kariert, schraffiert)

Die Isoelektrische Fokussierung kann auch in Gelen durchgeführt werden. Die Etablierung eines pH-Gradienten erfolgt dabei entweder unter Verwendung von frei beweglichen Carrier-Ampholyten oder über im Gel immobilisierte Ampholyte. Diese Gel-IEF wird routinemäßig für die Trennung von Proteinen und Peptiden verwendet. Diese haben durch geladene Aminosäuren viele geladene Gruppen innerhalb eines Moleküls, deren Ladungszustand stark vom pH-Wert abhängt.

Die Diffusion der Analyten wirkt der Fokussierung entgegen. Sobald kein elektrisches Feld mehr anliegt, verbreitert die Diffusion die Banden. Dieser Effekt ist bei großen Molekülen wie Proteinen zu vernachlässigen, bei kleinen Molekülen ist Diffusion von größerer Bedeutung. Einen Überblick verschafft der Vergleich der

Diffusionskoeffizienten. Dieser liegt für kleine Moleküle bei $1-1,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ im Vergleich zu Proteinen mit ca. $1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (University of Illinois). Der Unterschied von einer Größenordnung zeigt deutlich den größeren Einfluss der Diffusion bei kleinen Molekülen und damit die Gefahr der Bandenverbreiterung.

4.1.2 Trennung von Metallspezies mit Kapillarelektrophorese (CE)

Bei der Kapillarelektrophorese (CE) werden geladene Analyten in einem Puffersystem innerhalb einer Kapillare in einem elektrischen Feld getrennt. Die Verwendung einer Kapillare als Trennstrecke minimiert die durch den Strom entstehende Joulesche Wärme.

Im Gegensatz zum präparativen Maßstab entsteht bei der CE durch den geringen Durchmesser der Flüssigkeitssäule ein elektroosmotischer Fluss (EOF). Bei der Kapillarzonenelektrophorese (CZE), die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde, bestehen die Kapillaren aus underivatisiertem Quarzglas. Die freien Silanolgruppen sind, in Abhängigkeit vom pH des verwendeten Puffers, teilweise bzw. überwiegend deprotoniert, dadurch ist die Wand der Kapillare negativ geladen und es bildet sich eine positiv geladene Grenzschicht an der Kapillarinnenwandung. Durch den kleinen Innendurchmesser und die Hydratisierung der Kationenschicht wird die gesamte Flüssigkeitssäule zur Kathode bewegt. Dadurch wird am kathodischen Ende der Kapillare sowohl die Detektion von Kationen ermöglicht als auch die Detektion von Neutralteilchen und von Anionen, deren elektrophoretische Mobilität geringer ist als der EOF. Die Trennleistung wird durch den EOF positiv beeinflusst. Da die Flüssigkeitssäule durch das homogene Feld bewegt wird, entsteht ein flaches Strömungsprofil und die entstehenden Peaks werden schmaler als bei einem parabolischen Strömungsprofil wie es z.B. bei der HPLC durch inhomogene Druckverteilung erzeugt wird. Ein weiterer Vorteil der CE gegenüber der HPLC besteht in der Trennung ohne Verwendung einer stationären Phase. Dadurch wird eine Peakverbreiterung durch Eddy-Diffusion, also unterschiedlich lange Wege der Probenmoleküle durch die Partikel gepackter stationärer Phase, vermieden.

Standarddetektoren bei CE sind UV-Detektoren und Leitfähigkeitsdetektoren. Auch eine Kopplung mit massenspektrometrischer Detektion ist möglich. In dieser Arbeit erfolgt die Detektion mit UV und kontaktloser Leitfähigkeitsmessung.

Zur Probenaufgabe wird die Kapillare zunächst mit Pufferlösung gefüllt. Danach wird die Kapillare in die Probenlösung eingetaucht und eine Probenzone wird in die

Kapillare eingebracht. Das geschieht entweder über das Anlegen eines Druckes (hydrodynamisch) oder durch Anlegen einer Hochspannung (elektrokinetisch). Das Ende der Kapillare wird wieder in den Puffer getaucht und eine Hochspannung angelegt.

Werden die Proben mit reinem Wasser verdünnt oder handelt es sich um wässrige Lösungen mit niedrigerer Grundleitfähigkeit als der verwendete Puffer, wird eine Probenfokussierung (Stacking) verursacht. Die Feldstärke des elektrischen Feldes verhält sich umgekehrt proportional zur Leitfähigkeit, welche in der Probenzone deutlich geringer ist als in der Pufferlösung. Das führt dazu, dass die Analytmoleküle in der verdünnten Probenlösung stark beschleunigt werden. An der Grenze zur Pufferzone werden die Ionen dann durch die Abnahme des elektrischen Feldes im Puffer verlangsamt und auf diese Weise fokussiert. Das führt zu einer verbesserten Trennleistung in der CE.

Kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion in der CE

Bei der Leitfähigkeitsmessung in Flüssigkeiten werden im einfachsten Fall zwei Elektroden in der Lösung verwendet, die an eine Spannungsquelle angeschlossen sind. Dabei kommt es jedoch zu Problemen, da die Elektroden verschmutzt oder angegriffen werden. Dadurch sind die Messungen schlecht reproduzierbar und es können Effekte wie Elektrolyse und Korrosion an den Elektroden auftreten. Um diese Problematik zu umgehen, die Reproduzierbarkeit zu verbessern und die Lebensdauer der Elektroden zu erhöhen, gibt es die kontaktlose Leitfähigkeitsmessung. Diese ist gut geeignet für die Detektion an CE-Geräten. Bei der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung befinden sich die verwendeten Elektroden außen an der Kapillare und sind somit von der Probe getrennt. Es ist keine separate Messzelle nötig, die Messung erfolgt in der Trennkapillare. Eine Änderung der Leitfähigkeit der Probe zwischen den Elektroden wird durch eine kapazitive Kopplung als Signal erfasst, daher handelt es sich hierbei um C⁴D (capacitively coupled contactless conductivity detection) (Abbildung 8). Ein Beispiel für die Anwendung von CE mit C⁴D für die Trennung und Detektion von pflanzenrelevanten Metallkomplexen ist in der Literatur zu finden [67]. Xuan et al. nutzte die C⁴D für die Detektion von NA und PSen bzw. deren Metallkomplexen im Anschluss an die CE-Trennung.

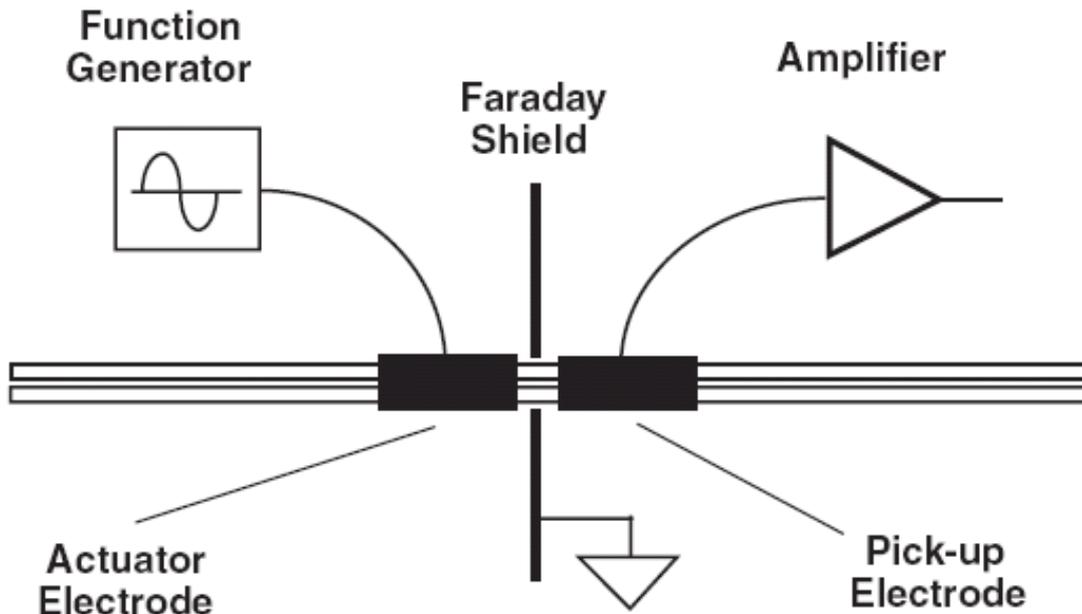


Abbildung 8: Aufbau der C⁴D (capacitively coupled contactless conductivity detection); aus [68]

4.2 Speziesanalyse: Chromatographische Trennung von Metallspezies, geeignete Trennprinzipien

Für die Trennung von Metallspezies in Pflanzenproben stehen chromatographische Verfahren zur Verfügung. Da es sich bei den vorliegenden Analyten um kleine, sehr polare und/oder geladene Komplexe handelt, muss die Art des Trennverfahrens dazu passend gewählt werden. Geladene Analyten können mit der Ionenchromatographie getrennt werden. Dabei werden die Analyten an geladenen Ionenaustauschern über ionische Wechselwirkungen retardiert. Da die Ladungsverteilung bei Metallkomplexen i. d. R. nicht gleichmäßig ist, wirken die elektrostatischen Kräfte nicht auf das Molekül als Ganzes, sondern besonders stark auf den Ort der größten positiven bzw. negativen Ladung im Molekül. Kationenaustauscher wechselwirken mit dem Metall des Komplexes, Anionenaustauscher mit dem Liganden [69]. Dabei wird die Metall-Ligand-Bindung weiter polarisiert und somit geschwächt, bis hin zum Bindungsbruch (Dissoziation). Außerdem erfordert die Elution vom Ionenaustauscher eine relativ hohe Ionenstärke im Eluenten und z. T. extreme pH-Bedingungen [69]. Damit wird die chemisch-physikalische Umgebung stark verändert, so dass es bei labilen Spezies nahezu ausgeschlossen ist, dass die Spezieszusammensetzung nach der Trennung noch den Gegebenheiten in der Probe entspricht. Außerdem

werden dabei ausschließlich geladene, nicht aber ungeladene polare Analyten erfasst. Daher ist die Ionenchromatographie nicht geeignet für die Analyse labiler Metallspezies.

Zur Trennung von unpolaren und leicht polaren Molekülen wird die Umkehrphasenchromatographie (RP-Chromatographie) eingesetzt. Dabei erfolgt die Trennung durch Verteilung zwischen einer unpolaren stationären Phase und einem polarerem Eluenten. Sehr polare und geladene Analyten werden so gut wie nicht retardiert und eluieren in der Durchflusszeit. Für polare Analyten ist eine Trennung über eine Normalphasenchromatographie (NP-Chromatographie) möglich, allerdings nur für ungeladene Analyten, die vollständig in organischen Lösungsmitteln löslich sind [70]. Als stationäre Phase dient hier ein sehr polares Material, wie z.B. underivatisiertes Kieselgel, und die Elution erfolgt mit unpolaren Laufmitteln. Im Gegensatz zur RP-Chromatographie können polare oder geladene Substanzen dabei sehr starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen, so dass sie zum Teil nicht mehr von der Säule eluiert werden können.

Eine dritte chromatographische Trennmethode, deren Potential erst in den letzten Jahren zunehmend erkannt wurde, ist die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC). Die Bezeichnung HILIC wurde 1990 zuerst von Alpert vorgeschlagen [71]. Bei HILIC handelt es sich um eine Chromatographie auf den stationären Phasen der NP-Chromatographie mit den Eluenten der RP-Chromatographie. Damit lassen sich erfolgreich polare und geladene Analyten trennen, die sonst klassischerweise mittels Ionenchromatographie getrennt würden.

Bei HILIC handelt es sich um eine Verteilungschromatographie, in der aber Wechselwirkungen mit dem Festphasenmaterial ebenfalls eine Rolle spielen können. An der polaren stationären Phase bildet sich eine immobilisierte Wasserschicht aus. Die Verteilung der Analyten zwischen dieser wasserreichen Grenzschicht und dem wasserarmen Eluenten findet dann abhängig von der Ladung oder Polarität der Analyten statt. Die geladenen Analyten bilden stärkere Wechselwirkungen mit der wasserreichen Schicht aus als die ungeladenen polaren; die schwächsten Wechselwirkungen finden bei nur schwach polaren Analyten statt. Allerdings ist der Trennmechanismus nicht auf reine Verteilung beschränkt [72]. Die Trennung beruht außerdem auf Wechselwirkungen mit funktionellen Gruppen der stationären Phase, sofern vorhanden, z. B. auf schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen. Die Vielfalt der möglichen stationären Phasen ist eine

Besonderheit bei HILIC. Es gibt ungeladene Phasen, wie Diolphasen oder Aminophasen, die kaum elektrostatische Wechselwirkungen zeigen. Daneben gibt es zwitterionische Phasen, wie Sulfobetainphasen, die schwache elektrostatische Wechselwirkungen zeigen und, je nach pH-Wert, geladene Amidphasen mit starken elektrostatischen Wechselwirkungen (Beispiele sind in Abbildung 9 zu sehen). Auch underivatisiertes Kieselgel wird eingesetzt. Die damit zur Verfügung stehende Bandbreite der möglichen Wechselwirkungen mit der stationären Phase bietet vielfältige Möglichkeiten der Trennung verschiedener Analyten. Die Vorhersage des Trennverhaltens kann im Einzelfall jedoch genau deshalb sehr schwierig werden.

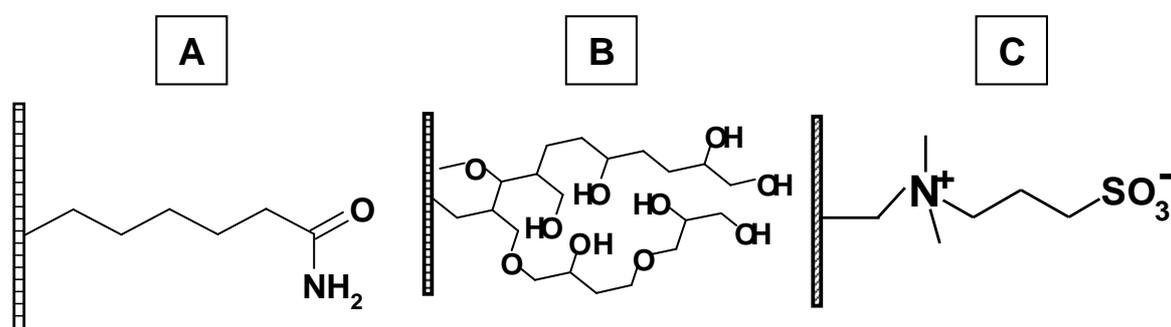


Abbildung 9: Beispiele für die Struktur kommerzieller HILIC-Phasen A) Amidphase (Amide-80, Tosoh); B) quervernetzte Diolphase (Luna-HILIC, Phenomenex); C) Sulfobetainphase (Zic-HILIC, Sequant)

In der Mischung aus Verteilung und schwachen Wechselwirkungen mit der stationären Phase liegt der gravierende Unterschied zur Ionenchromatographie, bei der die starken Wechselwirkungen mit den Ladungen der Ionenaustauscher direkt auf die Analyten einwirken. Aber nicht nur die Wechselwirkungen mit der stationären Phase sind moderat, auch die Laufmittel sind unter HILIC-Bedingungen schonender. Die Laufmittel bestehen aus Gemischen von wässrigen Pufferlösungen mit organischen Lösungsmitteln. Durch die nur schwach ausgeprägten Wechselwirkungen mit der stationären Phase sind nur geringe Pufferkonzentrationen erforderlich (<100 mM) [73]. Die Elution erfolgt durch die Erhöhung der Polarität des Laufmittels und ist damit umgekehrt zur RP-Chromatographie. Meist wird Acetonitril (ACN) als organisches Lösungsmittel verwendet, das mit wässrigen Puffern meist eine gute Trenneffizienz zeigt [73].

4.3 Speziesanalyse: Identifizierung labiler Metallspezies

4.3.1 Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Nicht nur die Trennung der Metallspezies muss an die Erfordernisse angepasst werden, die sich durch geringe Stabilität der Analyten und hohe Komplexität der Proben [74] ergeben. Auch die Detektion muss zum einen schonend sein, um eine zerstörungsfreie Detektion zu ermöglichen, zum anderen muss die Sensitivität hoch genug sein, um auch geringste Analytmengen erfassen zu können [75]. Da die molekulare Struktur der Komplexe stark unterschiedlich und zum Teil noch unbekannt ist, kommt nur ein Detektor in Frage, dessen Detektionsprinzip unterschiedlichste Analyten erfassen kann. Universelle Detektoren, wie z. B. UV-Detektoren oder Leitfähigkeitsdetektoren, sind wegen ihrer geringen Spezifität ungeeignet. Die Detektion sollte möglichst viele Informationen, wie Molekülmasse und Molekülstruktur, zugänglich machen, um eine möglichst eindeutige Identifizierung auch bisher unbekannter Analyten zu ermöglichen. Detektoren wie UV-, Leitfähigkeits- oder Lichtbrechungsdetektoren bieten wenige Informationen zur Identifizierung. Eine Detektion mit ICP-MS bietet elementspezifische Informationen mit niedriger Nachweisgrenze, jedoch keine Strukturinformationen [75]. IR- und NMR-Kopplungen bieten viele Strukturinformationen bei geringen Nachweisgrenzen, sind jedoch relativ kompliziert realisierbar. Mit MS sind die Detektionsgrenzen niedrig genug, um auch gering konzentrierte Analyten wie in komplexen Pflanzenmatrices detektieren zu können und dank der Möglichkeit von MS-MS-Experimenten lassen sich Informationen zur Struktur und damit Identität der Analyten ermitteln.

Ein wichtiger Schritt in Richtung einer schonenden Detektion ist die Auswahl einer geeigneten Ionisationsmethode. Bei der Analytik von Metallen gehört die ICP zum Standardvorgehen [76]. Sie bietet eine gute Sensitivität für die Metalle, allerdings ist die ICP eine destruktive Ionisationsmethode, bei der keinerlei Informationen über die Komplexe mehr zugänglich sind [77]. Die API-Methoden (Atmospheric Pressure Ionization) sind dagegen sehr schonend bei guter Sensitivität [70]. Bei der APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) wird im Gegensatz zur ESI (Elektrospray Ionization) eine Ionisierung in der Gasphase durchgeführt, wodurch die Bedingungen weniger schonend sind als bei einer Ionisierung aus der Flüssigkeit [75]. Dadurch tritt bei der APCI im Vergleich zur ESI mehr Fragmentierung auf. Die APCI wird hauptsächlich für weniger polare Analyten verwendet, während die ESI auch für sehr

polare und geladene Analyten geeignet ist [75]. Auch die bei der HILIC-Trennung verwendeten wässrigen Laufmittel mit hohem ACN-Gehalt sind gut mit der ESI kombinierbar [72].

Da in dieser Arbeit vollständige Komplexe mit minimierter Fraktionierung bzw. Adduktbildung nach einer HILIC-Trennung detektiert werden sollen, ist die fragmentierungsarme ESI die Ionisationsmethode der Wahl.

Bei der ESI wird die Probe, die positiv und negativ geladene Analyten enthält, durch eine Metallkapillare geleitet, an der eine kV-Spannung anliegt. Durch diese Spannung entsteht ein starkes elektrisches Feld, in dem die geladenen Tröpfchen, wenn sie aus der Kapillare austreten, zur Gegenelektrode beschleunigt werden. Ist die Kapillare negativ geladen, werden die negativen Ionen an der Flüssigkeitsoberfläche durch die Anziehung der Gegenelektrode angereichert und bildet der sog. Taylor Cone. Daraus werden negativ geladene Tröpfchen zur Gegenelektrode beschleunigt. Die positiv geladenen Ionen werden an der negativ geladenen Kapillare entladen. Die entstandenen negativ geladenen Tröpfchen werden durch die Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert, bis sich die Ladungen nahe genug kommen, um sich gegenseitig abzustößen („Rayleigh-Limit“) und das Tröpfchen in der sog. „Coulomb-Explosion“ in kleinere Tröpfchen und schließlich einzelne geladene Moleküle zu zersprengen (s. Abbildung 10). Diese werden dann im Massenspektrometer detektiert. Die Detektion von positiven Ionen lässt sich mit umgekehrten Ladungen der Kapillare und der Gegenelektrode realisieren. Beide Ionenarten gleichzeitig sind nicht zu messen.

Sowohl bei positiver als auch bei negativer Ionisation entstehen einfach und mehrfach geladene Molekülionen, $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ oder $[M-H]^-$, $[M-2H]^{2-}$ und Addukte, wie z.B. Ammoniumaddukte, aber so gut wie keine Fragmente. Diese schonende Ionisierung ist die Voraussetzung für die Detektion von intakten Komplexen und die Bestimmung der Molekülmasse. Strukturinformationen werden durch MS^n -Experimente gewonnen.

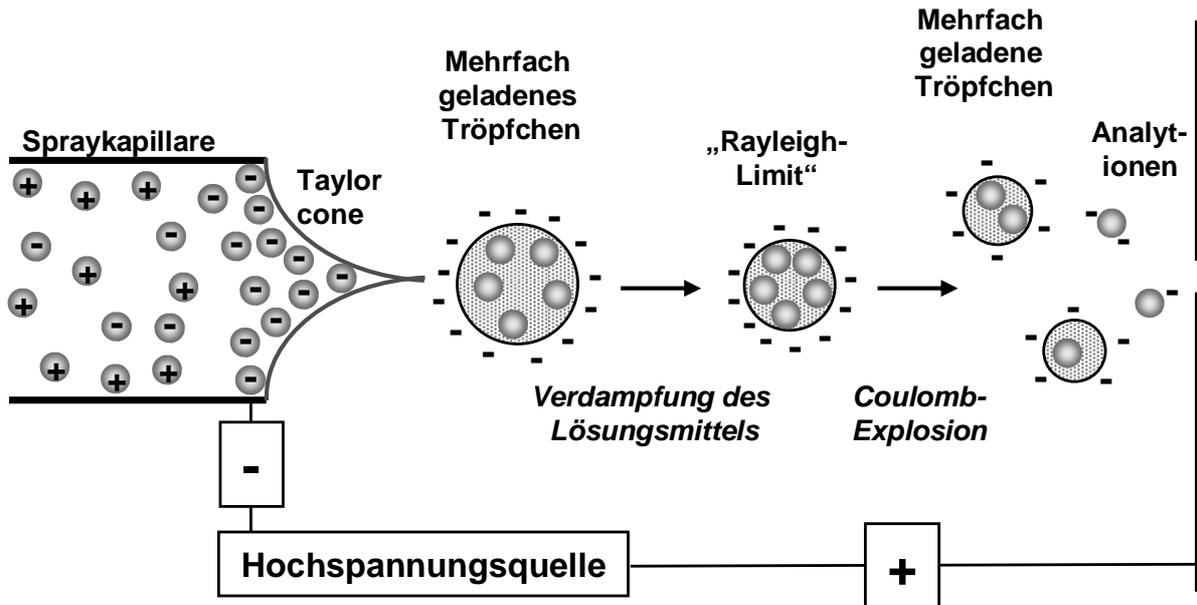


Abbildung 10: Generierung von Ionen mit Elektrosprayionisation (ESI) [78]

4.3.2 Massenspektrometrische Detektion

Im Massenspektrometer werden Substanzen anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Messungen zwei unterschiedliche Geräte eingesetzt. Die meisten Untersuchungen wurden mit dem (niedrigauflösenden) LCQ-Deca-Massenspektrometer durchgeführt, das eine Quadrupol-Ionenfalle als Massenanalysator besitzt. Diese Ionenfalle besteht aus einer zylindrischen Ringelektrode mit Ein- und Auslassloch. Die ausserhalb der Falle generierten Ionen werden durch elektromagnetische Felder innerhalb gesammelt bzw. durch Änderung der Felder gezielt aus der Falle gelassen. Die mit diesem Gerät zu erwartende Massengenauigkeit liegt bei 150 mmu.

Für die Fälle, in denen eine besonders hohe Massenauflösung bzw. Genauigkeit erforderlich war (insbesondere bei der Untersuchung der biologischen Pflanzenserie), wurde ein hochauflösendes LTQ Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Hybrid Massenspektrometer benutzt. Dieses Spektrometer ist ein Hybridgerät mit linearer Ionenfallen- und FTICR (Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonance) Technik, das LC-MS-Analysen mit Hochauflösung ermöglicht. Mit diesem Gerät wird mit einer Massengenauigkeit von <2 ppm und einer maximalen Auflösung von bis zu 750 000 gemessen. Das ist bei der Unterscheidung kritischer Paare wie z. B. den Phytosiderophor-Komplexen $[NA Zn^{II}]^-$ ($m/z =$

364,0487046) und $[\text{DMA Cu}^{\text{II}}]^-$ ($m/z = 364,0331742$) mit einer Massendifferenz von nur 0,0145 u von besonderer Bedeutung.

Bei der massenspektrometrischen Messung wurden neben dem SIM-Scan (Selected Ion Monitoring) auch MS^2 -Analysen durchgeführt. Dabei werden bestimmte Ionen in der Ionenfalle isoliert, durch die Kollision mit Dämpfungsgas fragmentiert und die Fragmente detektiert, um durch das Fragmentierungsmuster Rückschlüsse auf die Struktur ziehen zu können.

4.4 Stand der Technik Speziesanalyse in Pflanzen

4.4.1 IEF für Metalle bzw. Metallspezies

Die IEF trennt amphotere Analyten nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI), konzentriert dadurch die Analyten in scharfe Banden und trennt gleichzeitig einen großen Teil der Matrix ab. Das macht die IEF zu einer attraktiven Methode für die mehrdimensionale Trennung von sehr komplexen biologischen Matrices. Eine der wichtigsten Anwendungen der IEF ist die der ersten Dimension einer zweidimensionalen Gelelektrophorese. Darauf folgt in der Regel eine SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Diese dient der Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße ungeachtet ihrer Eigenladungen.

Bereits Svenson konnte als einer der Pioniere dieser Trenntechnik zeigen, dass die Methode sich besonders gut eignet, um Peptide und Proteine zu trennen [79-80].

Danach hat die IEF sich in den letzten Jahrzehnten zu einer robusten und verlässlichen Standardmethode im Bereich der Proteinanalytik entwickelt.

IEF ist auch für kleine Moleküle geeignet, sofern diese einen pI besitzen, der sich im experimentell realisierbaren pH-Bereich befindet. In der vorliegenden Arbeit lag der durch die Carrier-Ampholyte generierte pH-Gradient zwischen pH 3 und 10. Beispiele für die Trennung kleiner Moleküle sind Trennungen von Aminosäuren [81] und Seleno-Aminosäuren [82]. Für die IEF von Aminosäuren sind nur wenige Arbeiten bekannt, da es für diese Anwendung angesichts einer Vielzahl alternativer Methoden nur einen geringen Bedarf gibt. Es gibt zahlreiche Methoden mizellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) für die Aminosäureanalyse in verschiedensten Matrixgruppen wie humanen Proben, Lebensmitteln, Pflanzen, Pilzen oder Algen [83]. Es existieren kapillarelektrophoretische Untersuchungen und Methoden zur Analyse von derivatisierten und nicht derivatisierten Aminosäuren [84].

Auch die Analyse von Aminosäuren mit HPLC ist gut etabliert [85-86].

Für proteingebundene Metalle wurde IEF bereits in den 1990ern verwendet [87-88]. Kleine, kovalente Selenspezies wurden mit Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und kapillarer isoelektrischer Fokussierung (cIEF) getrennt [82, 89].

Eine elektrophoretische Fokussierung von Metallionen wurde schon in den 1950ern, entlang eines pH-Gradienten und eines Konzentrationsgradienten metallkomplexierender Liganden durchgeführt [90-92]. Weiterführende Studien wurden unter der Einbeziehung von Isotachophorese durchgeführt [93]. Bei all diesen Arbeiten waren allerdings immer die Metallionen im Fokus und nicht die Metallkomplexe.

4.4.2 Speziesanalyse in Pflanzen

In der Analytik von Metallverbindungen in Pflanzen sind bisher nur wenige Spezies eindeutig identifiziert. Bei den bisher analysierten handelt es sich vor allem um stabile Spezies. Da besonders die Metallaufnahme bei Strategie-II-Pflanzen gut untersucht ist, waren die Metallkomplexe von Nicotianamin (NA) und Phytosiderophoren (PS) Gegenstand von Untersuchungen.

Für die Analytik der Metallkomplexe von NA dominieren Methoden, die auf CE- [67, 94] und HPLC-Trennungen [36-37, 95] beruhen. Neben HILIC-Methoden existieren einige Methoden, bei denen die Analyten über eine RP18-Phase getrennt werden. Die Detektion erfolgt entweder über UV-Detektion mit Nachsäulenderivatisierung [96] oder massenspektrometrische Detektion [97]. Eine Trennung über Anionenaustauschchromatographie wurde kombiniert mit pulsamperometrischer Detektion [98]. All diese Methoden erfassen ausschließlich die freien Liganden, nicht aber die Metallchelate.

Dies gelang erst durch die Entwicklung einer HILIC-ESI/MS-Methode, mit der NA und die MA-Phytosiderophore genauso getrennt werden konnten wie Eisen-(III)-Komplexe von DMA und NA und deren Komplexe mit zweiwertigen Metallionen (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+}) [37]. Die Fe(II)- und Fe(III)-Komplexe von DMA und NA in Pflanzenproben wurden von Weber et. al. [99] ohne Trennung identifiziert. Dafür wurde FTICR-Massenspektrometrie verwendet, was durch eine hohe Massengenauigkeit die eindeutige Identifizierung von Analyten mit sehr geringen Unterschieden im Masse-Ladungs-Verhältnis, v. a. die Unterscheidung kritischer Komplexpaare ermöglicht. So konnte eine Unterscheidung zwischen kritischen

Analyten wie z. B. Fe^{2+} -NA, Fe^{3+} -Na, Fe^{2+} -DMA und Fe^{3+} -DMA gewährleistet werden.

In der Einleitung wurden bereits Beispiele von Metallspezies herausgestellt, die in Pflanzen nach bisherigem Erkenntnisstand eine bedeutende Rolle spielen. Während Eisen-Citrat-Komplexe als Transportform von Eisen von Bedeutung sind, wird für Kupfer neben großen Metalltransportern Histidin als wichtiger kleiner Transportligand angesehen. Eine eindeutige Identifizierung von Citrat- und Histidin-Spezies konnte bisher jedoch nicht durchgeführt werden. Im Gegensatz zu anderen Spezies existieren aber für diese Spezies vereinzelte theoretische und indirekte Daten und Untersuchungen. Da an diesen Spezies ein großes Interesse besteht, wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Untersuchung dieser zwei Transportsysteme begonnen, um sie systematisch näher zu charakterisieren.

Eisen in Verbindung mit Citrat ist nicht nur in Pflanzen von Bedeutung. Viele der bisherigen Analytikdaten stammen aus dem medizinischen Bereich, wie z. B. der Analyse von Blutplasma [100] und Serum [101], bei der theoretische Kalkulationen zur potentiellen Stöchiometrie der Eisen-Citrat-Komplexe erstellt wurden. Bei den dabei vorhergesagten Strukturen handelt es sich hauptsächlich um 1:1 (FeCit)- und 1:2 (FeCit_2)-Stöchiometrien. Die strukturelle Identifizierung von Eisen-Citrat-Spezies mit unterschiedlicher Stöchiometrie erfolgte über Röntgen-Spektroskopie [27], die sechs verschiedene Komplexe in kristallisierter Form identifizierte. Zusätzlich wurden mittels Massenspektrometrie fünf dieser Komplexe mit 1:2-, 2:2-, 2:3-, 3:3- und 3:4-Stöchiometrien in Lösung detektiert. In einer weiteren Arbeit [26] wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, die zudem bewiesen, dass der pH-Wert und das Eisen-Citrat-Verhältnis einen erheblichen Einfluss auf die Spezieszusammensetzung hat. Die Trennung der bereits identifizierten Eisen-Citrat-Spezies steht dagegen noch ganz am Anfang der Methodenentwicklung. Zu Beginn dieser Arbeit existierte noch keine etablierte Methode, mit der unterschiedliche Eisen-Citrat-Spezies getrennt werden können.

Zur Struktur von Kupfer-Histidin-Komplexen gibt es bisher wenige Daten, jedoch konnte ein einfach positiv geladener CuHis_2 -Komplex in Blutplasma nachgewiesen werden [102]. Außerdem wurde gezeigt, dass in wässriger Lösung Komplexe mit 1:1-, 1:2- und 2:2-Stöchiometrie gebildet werden. Die Komplexe mit einer 1:2 Stöchiometrie wurden dabei näher charakterisiert und als zwei verschiedene

Koordinationen, die nebeneinander existieren und miteinander im Gleichgewicht stehen [103], detektiert.

Die molekulare Struktur der Kupfer-Histidin-Spezies wurde schon in den 60er Jahren erforscht [104] und es wurde gefolgert, dass im 1:2-Komplex eine Bindung zur aliphatischen Aminogruppe und zur Carboxygruppe des Histidins stattfindet. Zur Untersuchung von 1:1-Komplexen aus Kupfer und anderen Metallen mit Histidin wurden massenspektrometrische Experimente durchgeführt [105]. Kupfer-Histidin-Komplexe mit anderen Stöchiometrien (neben 1:1 auch 1:2 und 2:2) wurden durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie identifiziert [103]. Die ESR eignet sich ausschließlich für paramagnetische Moleküle und kann nicht mit Trennverfahren gekoppelt werden. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine etablierten Trennverfahren für Kupfer-Histidin-Komplexe bekannt. Diese Lücke soll im Laufe der Arbeit geschlossen werden.

4.5 Softwaregestützte Non-targeted Analyse

Bei der Betrachtung von komplexen Zusammenhängen, wie dem Metalltransport in Pflanzen, ist es nicht ausreichend, nur eine oder wenige Metallspezies zu bestimmen. Da die molekularen Zusammenhänge fast vollständig ungeklärt sind, lassen sich im Voraus nicht alle Substanzen definieren, die möglicherweise als Liganden dienen. Das unzureichende Wissen über Metaboliten, die über Stoffwechselwege mit Liganden oder Spezies in Zusammenhang stehen, erschwert zudem eine detaillierte Analytik. Um Schlussfolgerungen in Bezug auf biologische Zusammenhänge treffen zu können, ist es daher notwendig, die vorherrschenden Gleichgewichte zwischen unterschiedlichen Spezies zu bestimmen und gleichzeitig umfassend die Metaboliten und potentiellen Liganden zu erfassen.

Die Pflanzenproben werden aufgrund der geringen Stabilität der Metallkomplexe keiner Vortrennung unterzogen, weshalb die zu analysierenden Proben sehr komplex sind. Dadurch ist auch die Datenmenge, die bei der MS-Analyse erzeugt wird, sehr umfangreich und komplex. Bei der manuellen Auswertung mit handelsüblicher Software wird nach einzelnen m/z -Verhältnissen gesucht. Dazu werden die Massenspuren von manuell eingegebenen m/z -Listen extrahiert und ausgewertet. Dieses Vorgehen beschränkt die Auswertung auf die Analyse bekannter Spezies, da nur nach dem m/z -Verhältnis gesucht werden kann. Das systematische Erfassen bis

dahin unbekannter Spezies ist somit nicht möglich. Übergeordnete Zusammenhänge, bei denen außer den Metallkomplexen noch andere Metaboliten eine Rolle spielen, lassen sich mit herkömmlicher Software nicht aufschlüsseln. Um bisher unbekannte Zusammenhänge zu erkennen, inkl. der Mechanismen, die mit Metallspezies in Verbindung stehen, bieten sich softwaregestützte Lösungsansätze an, wie sie insbesondere für das „Metabolic Profiling“ oder „Fingerprinting“ entwickelt wurden. Ein Beispiel ist das Softwarepaket MZmine (Matej Orešič, Mikko Katajamaa, Tomáš Pluskal), das eine umfassende Non-Targeted Analyse von umfangreichen Rohdatensätzen, speziell für die Auswertung von LC-MS Daten ermöglicht [106-109]. Neben der Erfassung chromatographischer Signale und der Erstellung von Peaklisten bietet die Software weitreichende Darstellungsweisen und die Möglichkeit, mehrere Datensätze auf Basis bestimmter festgelegter Kriterien zu vergleichen und diese Vergleiche auch graphisch abzubilden. Zusätzlich bietet die Software die Möglichkeit, die Rohdaten einer Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis – PCA) zu unterziehen. Dabei werden die Datensätze allgemein anhand ihrer Merkmale (= chromatographische Signale) klassifiziert. Bei diesem Prozess ist die Definition der Parameter, anhand derer die chromatographischen Signale vom Programm identifiziert werden, von großer Wichtigkeit. Die in dieser Arbeit verwendeten Parameter sind in Kapitel 0 aufgeführt. Die PCA im Rahmen von MZmine bietet jedoch keine Information über die Identität der Komponenten, anhand derer sich die Gruppen von Datensätzen unterscheiden.

Diese Informationen lassen sich aber z. B. aus Vergleichen von Datensätzen bzw. Gruppen generieren, die etwa in Streudiagrammen dargestellt werden. Hier lassen sich Komponenten anhand von m/z sowie der Retentionszeit identifizieren und anhand von Signalhöhen und -flächen vergleichen.

Mithilfe dieser Auswertung können verschiedene Datensätze verglichen und neue Komponenten identifiziert werden, die für die Auswertung biologischer Datensätze von Bedeutung sein könnten. Beispiele hierfür werden in den folgenden Kapiteln demonstriert.

5 Experimentelles

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen alle p.a.-Qualität, sofern nicht anders vermerkt. Ammoniumacetat- und Titrisol-Stammlösungen mit Eisen(III), Nickel(II) und Zink(II) wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Galliumtrinitrat Octahydrat wurde in Specpure-Qualität von Johnson Matthey (London, UK) erworben. Das EDDHA bezogen wir in 86,3%iger Reinheit von Complete Green (El Segundo, CA, USA). Tris, Histidin und Glutathion (GSH, reduzierte Form) wurden in biochemischer Reinheit von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Von Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) stammen Cytochrom C, Myoglobin und MES, genauso wie das IEF-Kit IEF-M1A, das die acht *pI*-Standards im Bereich von 3,6 bis 9,3 enthält. Bio-Rad (Hercules, CA, USA) lieferte die Ampholyt-Lösungen im pH-Bereich 3-10 (Bio-Lyte), während die Ampholyte für den pH-Bereich von 2,5-5 (Pharmalyte) von Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) stammen. 2-Hydroxyethylcellulose (HEC, M ca. 90 000 g/mol) und TEMED wurden ebenfalls von Sigma-Aldrich bezogen. Für alle Lösungen in den IEF-Versuchen wurde Ultrapure-Wasser verwendet, das unter der Verwendung eines Millipore-Synergy-185-Wasseraufreinigungssystems erzeugt wurde.

Die Referenz-Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure wurden in biochemischer Reinheit (mindestens 98.5 %) von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen, Alanin und Arginin stammten von Merck (Darmstadt, Deutschland) und wurden ebenfalls in biochemischer Reinheit (mind. 99 %) eingesetzt. Das Phenylalanin wurde in 99%iger Reinheit von Fluka (Buchs, Schweiz) erworben. Das Citrat wurde in p.a.-Qualität eingesetzt und stammt von Roth (Karlsruhe, Deutschland), während das Eisen-Nitrat, das ebenfalls in p.a.-Qualität eingesetzt wurde, von Merck (Darmstadt, Deutschland) stammt. Ammoniak wurde als 25 %ige Lösung von Fluka (Buchs, Schweiz) geliefert.

Die Laufmittel für die LC-MS-Analyse wurden ausschließlich mit LC-reinen Chemikalien hergestellt. Ammoniumacetat und Essigsäure stammten von Sigma-

Aldrich (St.Louis, MO, USA), Acetonitril (ACN) wurde von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Wasser von Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) erworben. Außerdem wurde Wasser in LC-MS-Qualität verwendet, das unter Verwendung einer Purelab-Anlage (ELGA-LabWater) erzeugt wurde.

5.1.2 Geräte

Alle verwendeten Glasgeräte wurden vor der Benutzung mit heißen Salpetersäuredämpfen (p.a.) behandelt und anschließend mit Reinstwasser gereinigt, um Metallrückstände zu entfernen.

IEF, semipräparativer Maßstab

Die isoelektrische Fokussierung im semipräparativen Maßstab wurde mit einem Rotofor-System mit einer Mini-Fokussierungskammer von der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Das elektrische Feld in der Fokussierungskammer wurde von einer LKB 2197 Spannungsquelle von LKB (Bromma, Schweden) erzeugt.

Die UV-VIS-Spektren (200-600 nm) der IEF-Fraktionen wurden per Flow-Injection mit einem Merck/Hitachi L-4500 Diodenarray-Detektor (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Eisen und Kupfer im Konzentrationsbereich von 0,5 – 10 ppm wurden in IEF-Fraktionen durch Flammen AAS mit einem Hitachi Z8000 Atomabsorptionsspektrometer bestimmt. Dabei wurde mit einer Luft-Acetylen-Flamme gearbeitet und bei Wellenlängen von 324,8 nm für Kupfer und 248,3 nm für Eisen gemessen.

Die pH-Werte der einzelnen Fraktionen wurden mit einer micro-pH-Elektrode bestimmt.

cIEF, CE

Für die Messungen mit cIEF und CE wurde ein ATI Unicam Crystal CE Gerät Modell 310 verwendet. Das CE-Gerät kam mit einem Linear UVIS-201-Detektor zum Einsatz, der mit einer speziellen CE-Messzelle mit geringem Volumen ausgestattet war. In Serie mit dem UV-Detektor war ein kontaktloser Leitfähigkeitsdetektor (capacitively coupled contactless conductivity detector, C⁴D) geschaltet (Innovative Sensor Technologies, Österreich).

HPLC-MS

Für die ESI-MS Analysen stand ein Finnigan LCQTM Deca ESI-Massenspektrometer mit 3D-Ionenfalle von ThermoQuest, MA, USA zur Verfügung. Dazu wurde eine Finnigan TSP P4000 HPLC-Pumpe verwendet, ein Finnigan TSP SCM1000 Online-Degaser und ein AS3000 Autosampler (alle von ThermoQuest, MA, USA).

Die HPLC-MS-Untersuchungen der Probenreihe von Gerstenpflanzen wurden auf einem LTQ-FT-MS-Gerät von Thermo Fisher Scientific gemessen. Die Datenauswertung wurde mittels Xcalibur Software durchgeführt, die ebenfalls von Thermo Fisher Scientific stammt.

Für die Arbeit wurden 10 verschiedene HILIC-Säulen benutzt. Eine genaue Übersicht ist in Tabelle 2 dargestellt. Alle Säulen basieren auf Silicamaterial, an welches die funktionellen Gruppen kovalent gebunden sind.

Tabelle 2: Verwendete HILIC-Trennsäulen mit technischen Angaben (laut Herstellerinformationen)

Säule	Dimensionen [mm]	Partikelgröße [μm]	Porengröße [\AA]
TSKgel Amide-80 (Tosoh)	150x2	3	80
Luna-HILIC (Phenomenex)	150x2	3	200
Zic-HILIC (Sequant)	150x2,1	3,5	200
Nucleodur HILIC (Macherey-Nagel)	125x2	3	110
Kinetex HILIC (Phenomenex)	100x2,1	2,6	100
Luna NH2 (Phenomenex)	150x2	3,2	100
TSKgel-NH2-100 (Tosoh)	150x2	3	100
Acclaim Trinity P1 (Dionex)	100x2,1	2,6	k.A.
Kinetex PFP (Phenomenex)	100x2,1	3	100
Hypersil Gold PFP (Thermo Scientific)	150x2,1	3	175

5.2 Methoden

5.2.1 Biologische Proben

Die Probenvorbereitung erfolgte durch Kooperationspartner, die Forschungsgruppe Molekulare Pflanzenernährung aus der Abteilung Physiologie und Zellbiologie vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben unter der Leitung von Prof. von Wiren.

Die Blätter der Gerste wurden in flüssigem Stickstoff gefroren, im Mörser zermahlen und bei $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Von den gemahlenden Blättern wurden 0,8 g in 4 mL Wasser

suspendiert und im Mörser verrieben. Der Mörser wurde mit 2 mL Wasser ausgespült, diese wurden mit der Suspension vereinigt. Die Suspension wurde bei 4 °C und 3.500 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein vorgekühltes Gefäß überführt, der Rückstand wurde mit 2 mL Wasser auf dem Vortex aufgeschüttelt und erneut bei 4 °C und 3.500 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem Überstand des ersten Zentrifugationsganges vereinigt. Somit wurden 0,8 g Probe insgesamt mit 8 mL Wasser extrahiert. Die Proben wurden bis zur Messung bei -18 °C gelagert.

Unmittelbar vor der Messung wurden die Probenlösungen bei Raumtemperatur aufgetaut. Ein Aliquot von 100 µL wurde mit 100 µL Laufmittel B versetzt und geschüttelt. Die verdünnten Proben wurde durch einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert und so verbleibender Rückstand abgetrennt. Die klaren Proben wurden dann für die HPLC-Analyse eingesetzt.

5.2.2 Trennung mit IEF

IEF im semipräparativen Maßstab

Für die Standarduntersuchungen von EDDHA und EDDHA-Komplexen wurden Lösungen mit einer Konzentration von 50 mg/L EDDHA und äquimolaren Konzentrationen der jeweiligen Metallionen hergestellt. Dazu wurde das EDDHA eingewogen und unter Zugabe 1-2 Tropfen NaOH-Lösung in ca. 3 ml Wasser im Messkolben gelöst. Die Metalle wurden in Form von fertigen Standards in HCl (Titrisol) dazu dosiert. Danach wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und der Messkolben aufgefüllt.

Für die Fokussierung im Mini-Rotofor wurden 20 mL Standardlösung oder Probe mit 0,5 % Carrier-Ampholyten (pH-Bereich 3-10) in die Trennkammer gefüllt. Diese war auf der Anodenseite mit einem Säurereservoir mit Phosphorsäure der Konzentration 0,1 mol/L und auf der Kathodenseite mit einem Laugereservoir mit Natronlauge der Konzentration 0,1 mol/L verbunden, die durch Membranen von der Probe getrennt sind. Die Kühlung der Probe in der Trennkammer erfolgt über einen Kühlfinger im Inneren der Kammer, der mit der Kühlwasserzuleitung verbunden ist. In der Trennkammer wird durch Anlegen einer Spannung ein elektrisches Feld erzeugt. Dabei wird eine konstante Leistung von 15 W eingestellt. Im elektrischen Feld wandern alle geladenen Teilchen in Richtung der Anode oder der Kathode. Durch die Fokussierung der amphoteren Moleküle ändert sich die Spannung und die

Stromstärke, bis ein Maximum bzw. ein Minimum erreicht ist. Nach ca. 45-50 min wird der Inhalt der Trennkammer in 20 Fraktionen eluiert. Dazu wird die Probe mit 20 Kanülen mit Hilfe eines angelegten Vakuums simultan aus der Trennkammer abgesaugt. Eine anschauliche Darstellung findet sich in Abbildung 11.

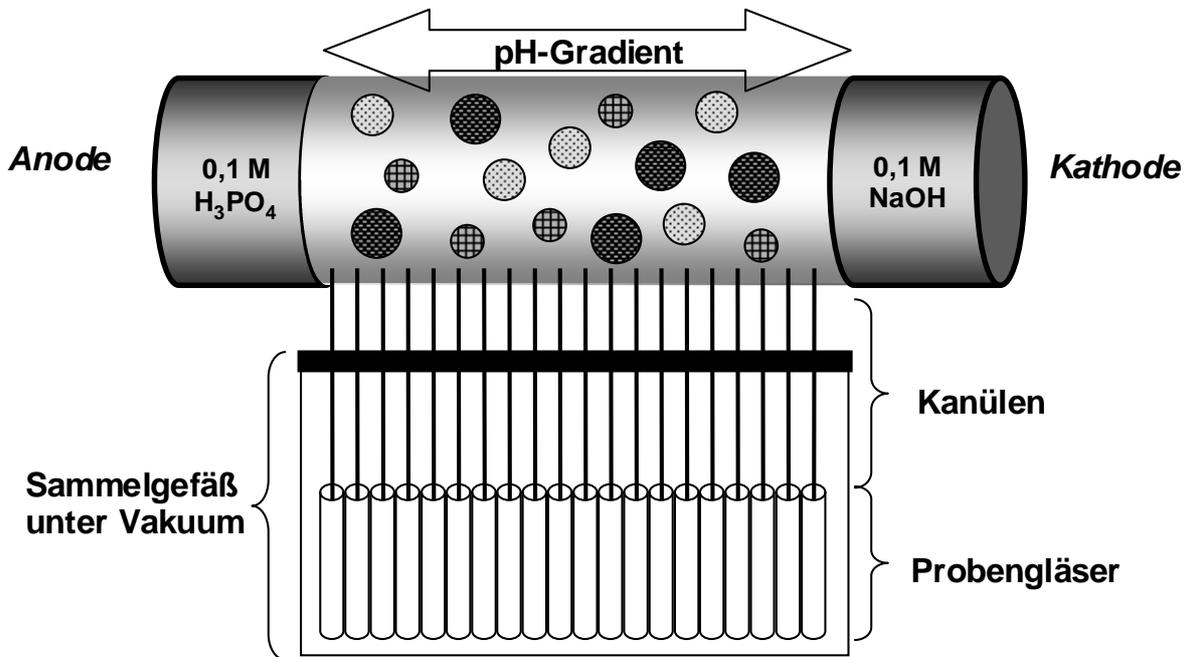


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Elution der durch semipräparative IEF getrennten Probe: die Kanülen werden simultan in den mit 20 Löchern versehenen und mit Klebefolie verschlossenen Probenzylinder eingestochen und die Lösung durch ein angelegtes Wasserstrahlvakuum eluiert. Die einzelnen Fraktionen werden in Probengläsern aufgefangen

In den einzelnen Fraktionen wurden die jeweiligen pH-Werte gemessen. Die Fraktionen konnten dann für weitergehende Analysen wie UV/VIS, AAS, MS oder LC-MS verwendet werden.

FIA-DAD von Trennfraktionen

Die Detektion des EDDHA-Standards und der EDDHA-Metallkomplexe erfolgte per Fließinjektionsanalyse mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors (DAD).

Messbedingungen für die DAD-Injektion:

Laufmittel: 50 mmol/l Ammoniumacetat in H₂O, pH 7

Injektionsvolumen: 20 µl

Flussrate: 1,0 ml/min
Wellenlängenbereich: 200-600 nm

AAS von Kupfer und Eisen

Eine Kontrolle der Metallverteilung innerhalb der Fraktionen wurde mit Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) durchgeführt. Die Quantifizierung der Eisenkonzentrationen erfolgte über eine Kalibrationsgerade im Bereich 1 – 10 mg/l Metall. Für die Messungen wurden die Fe-EDDHA-Standards und Probenlösungen (DMA-haltige Pflanzenprobe) mit 1 µl konz. Salpetersäure (HNO₃) pro ml Lösung angesäuert.

Messwellenlänge Cu: 324,8 nm
Messwellenlänge Fe: 248,3 nm
Gas: Luft/Acetylenflamme

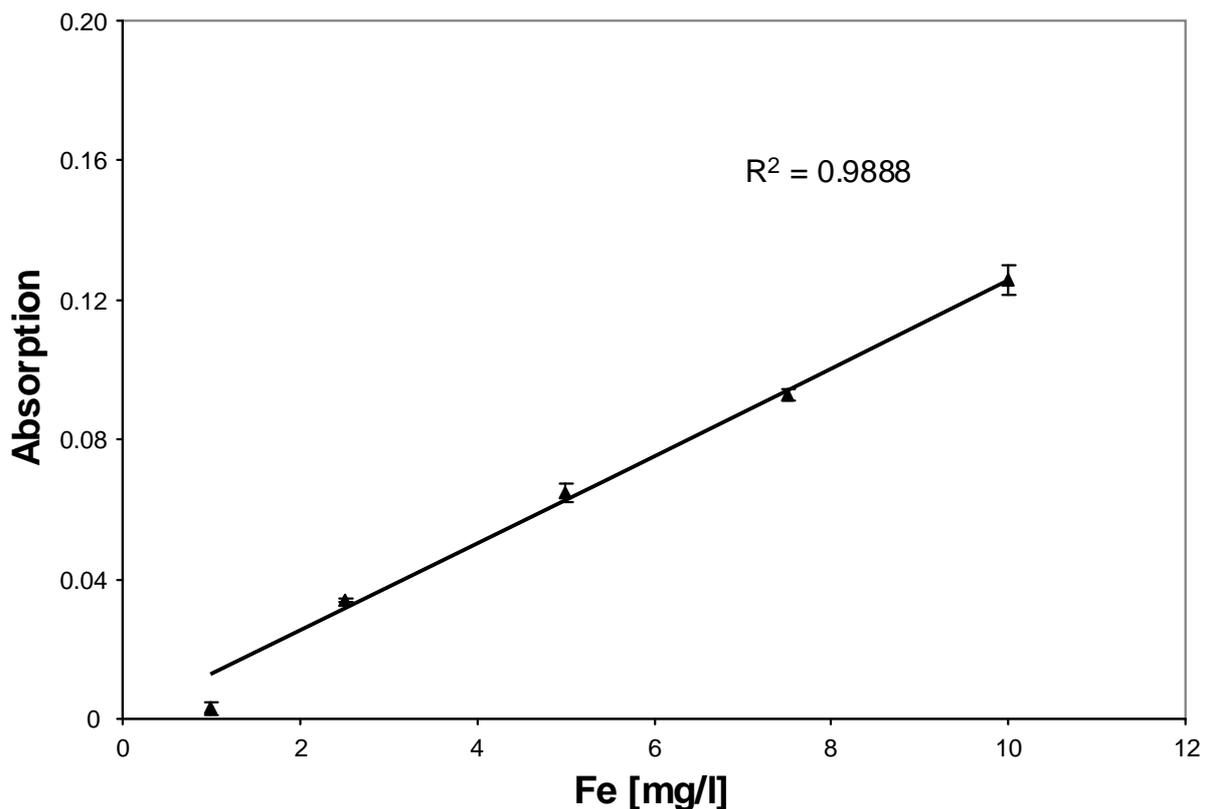


Abbildung 12: Kalibrationsgerade für die AAS-Bestimmung von Eisen, Konzentrationsbereich 1-10 mg/l, Mittelwert aus drei Messungen, Bestimmtheitsmaß 0,9888

cIEF

Für die Messungen mit der Kapillar-IEF wurde eine Fused-Silica-Kapillare (ID: 75 μm , AD: 360 μm) mit einer Länge von 65 cm verwendet. Die Länge bis zum UV-Detektor betrug 53 cm, bis zum C⁴D 45,5 cm. Die Probelösungen wurden mit 1 % Ampholyten (pH 3-10 Bio-Lyte oder pH 2,5-5 Pharmalyte), 0,2 % HEC (Hydroxyethylcellulose, M ca. 90000 g/mol) und 0,5 % TEMED (Tetramethylethylendiamin) versetzt. Das HEC erhöht die Viskosität der Lösung und sorgt für eine dynamische Belegung der Kapillarwand. Dadurch wird der EOF unterdrückt. Das TEMED fokussiert hinter den Detektoren an der Kathode, so dass kein Analyt hinter den Detektoren fokussieren kann und alle Analyten bei der Detektion mit erfasst werden.

Die Kapillare wurde hydrodynamisch mit der zu fokussierenden Probelösung gefüllt. Die Anodenlösung besteht aus 0,01 mol/l Phosphorsäure, die Kathodenlösung besteht aus 0,02 mol/l Natronlauge. Für die Fokussierung wurde eine Hochspannung von 15 kV angelegt. Das Ende der Fokussierung war erreicht, wenn der Stromfluss ein konstantes Minimum erreicht hatte (5-10 min). Am Ende der Fokussierung wurde der Kapillarinhalt durch hydrodynamische Mobilisierung mit einem Druck von 40 mbar bei weiterhin angelegter Hochspannung in Richtung Detektor geleitet. Die Detektion mittels UV-Vis wurde bei unterschiedlichen Wellenlängen durchgeführt.

5.2.3 Identifizierung von Metallspezies (Direktinfusionsexperimente)

Zu Beginn der Untersuchungen von Eisen-Citrat und Kupfer-Histidin wurden massenspektrometrische Messungen per Direktinfusion durchgeführt, um daran die Einstellungen des Massenspektrometers zu optimieren. Zunächst wurden die Einstellungen des Massenspektrometers mit der Autotune-Methode der verwendeten Xcalibur-Software optimiert. Dazu wurde der Metallkomplex-Standard in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ mit einem Fluss von 3-5 $\mu\text{l/min}$ per Spritzenpumpe in den Laufmittelfluss injiziert. Für weitere Messungen wurde das Tuning, also die automatische Optimierung der Detektionsparameter, mit Glutathion als Referenzsubstanz durchgeführt.

Anschließend erfolgte eine Analyse der Zusammensetzung der verwendeten Messstandards. Dieses Vorgehen war notwendig, da es für die Metallkomplexe keinerlei käuflich zu erwerbende Standards gibt bzw. die käuflichen Standards keine definierten Zusammensetzungen haben und sich beim Lösen ein unbekanntes

Speziesgleichgewicht einstellt. Da die exakte Stöchiometrie der Eisen-Citrat-Spezies zu Beginn der Arbeiten nicht bekannt war, wurde ein molares Verhältnis von 1:2 (Fe:Cit) verwendet, das die Bildung aller denkbaren Spezies ermöglicht.

Die Modellmischung (s. Material) wurde mit einem Fluss von 3-5 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die Spritzenpumpe in den Laufmittelfluss injiziert. Die erhaltenen Spektren wurden ausgewertet und die der Eisen-Citrate mit aus der Literatur [26-27] bekannten Spezieszusammensetzungen verglichen, um die Eignung der Modelllösungen als Messstandards und die Plausibilität der Messergebnisse zu überprüfen.

Laufmittel: A) 99:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5
 B) 1:99 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5
 Verhältnis 1:1
Flussrate: 0,2 mL/min
Spritzenpumpenfluss: 3-5 $\mu\text{L}/\text{min}$
m/z-Messbereich: 120-1000 u

5.2.4 Chromatographische Trennung von Metallspezies

Die grundlegenden systematischen Untersuchungen mit ESI-MS und HPLC-ESI-MS wurden an einem Gerät mit linearer Ionenfalle (LCQ Deca) durchgeführt. Für die Messreihe der Gerstenblätter stand ein hochauflösendes Fouriertransformations-Hybrid-MS (LTQ FT) zur Verfügung, bei dem selbst kritische Paare eindeutig unterschieden werden können. Ein Beispiel für ein solches Paar ist NA-Fe(II) mit $m/z=356,0551$ und DMA-Fe(III) mit $m/z=356,0312$, die nur 0,0239 u auseinanderliegen. Komplexe mit einer geringen m/z-Differenz wie bei diesem Beispiel lassen sich mit Hochauflösung voneinander unterscheiden, besonders da keine Standardsubstanzen für die untersuchten Komplexe verfügbar sind.

Um die Speziesgleichgewichte in der Probe möglichst nicht zu verändern, wurden die Trennungen bei Xylem-pH (pH 5,5) durchgeführt.

Klassifizierung verschiedener Säulenmaterialien

Für die Beurteilung, ob sich die in der Tabelle 2 aufgeführten stationären Phasen für eine Analyse von Metallkomplexen sowie verschiedenen Metaboliten eignen, wurde das Trennverhalten anhand einer Auswahl an Metaboliten (saure, neutrale und basische Aminosäuren, organische Säuren und kleine Peptide) charakterisiert. Eine

Übersicht über die verwendeten, in Pflanzen vorkommenden Standardmetabolite bietet Tabelle 3.

Tabelle 3: Auswahl von in Pflanzen vorkommenden Standardsubstanzen für die Klassifizierung unterschiedlicher HILIC-Materialien [110]

Verbindung	Verbindungs-klasse	pK_s	Ladungszustand bei pH 5,5
Phenylalanin (Phe)	unpolare, aromatische, neutrale AS	2,58 9,24	Ungeladen
Alanin (Ala)	unpolare, aliphatische, neutrale AS	2,3 9,9	Ungeladen
Histidin (His)	polare, aromatische, basische AS	1,78 6,04 8,97	Einfach positiv geladen
Arginin (Arg)	polare, aliphatische, basische AS	2,81 9,09 13,2	Einfach positiv geladen
Glutaminsäure (Glu)	polare, aliphatische, saure AS	2,19 4,25 9,67	Einfach negativ geladen
Asparaginsäure (Asp)	polare, aliphatische, saure AS	1,88 3,65 9,60	Einfach negativ geladen
Citrat (Cit)	organische Säure	3,13 4,76 6,40	Zweifach negativ geladen
Glutathion reduziert (GSH)	Tripeptid	2,17 2,21 9,13	Einfach negativ geladen

Die Standardmetaboliten wurden in einer Konzentration von 2 mmol/l in Wasser gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurde ein Gesamtstandard mit einer Konzentration von 200 µmol/l für jeden Metaboliten verdünnt. Zur Analyse wurde dieser Gesamtstandard im Verhältnis 1:1 mit Laufmittel B verdünnt, was eine Endkonzentration von 1 µmol/l für die Messung ergab. Die wässrigen Lösungen wurden bei 4 °C dunkel gelagert.

LC-MS-Analyse

Als Laufmittel für die HILIC-Trennungen an LCQ-Deca und LTQ-FT wurde ein Acetonitril-Wasser-Gradient verwendet. Da die Messmethode hauptsächlich für Xylem-transportierte Komplexe verwendet werden sollte, wurde der pH-Wert

entsprechend mit 10 mmol/l Essigsäure-Ammoniumacetatpuffer auf 5,5 eingestellt. Die Trennungen wurden mit einem binären Gradienten mit zunehmendem Wassergehalt durchgeführt.

LC-MS von Standards:

Die ESI-MS-Messungen der Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Standards wurden am LCQ-Deca Massenspektrometer im negativen Ionisationsmodus durchgeführt. Die verwendeten Trennbedingungen waren wie folgt:

Laufmittel: A) 99:1 H₂O/ACN mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5
 B) 1:99 H₂O/ACN mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5

Flussrate: 0,2 mL/min

Trennsäulen: unterschiedliche HILIC-Säulen (Tabelle 2)

Gradient:	min	A (%)	B (%)
	0	5	95
	3	5	95
	33	55	45
	45	55	45
	50	5	95
	60	5	95

Injektionsvolumen: 5 µL

Messbereich: 120-1000 m/z

Quellenspannung: 5,02 kV

Kapillarspannung: -23,13 V

Gase: Helium, Stickstoff

Temp. (Transferkapillare): 275 °C

LC-MS von IEF-Fraktionen:

Ein Teil der IEF-Fraktionen wurde MS, bzw. HPLC-MS analysiert. Dazu wurden die Probenlösungen im Verhältnis 1:1 mit Laufmittel B verdünnt. Die MS- und HPLC-MS-Messungen am LCQ-Deca Massenspektrometer wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Laufmittel: A) 95:5 H₂O/ACN mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5
 B) 5:95 H₂O/ACN mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5

Flussrate: 0,2 ml/min

Direktinjektion: LM A und B im Verhältnis 50:50

Gradient:	min	A (%)	B (%)
	0	5	95
	3	5	95
	33	70	30
	45	70	30
	50	5	95
	60	5	95

Injektionsvolumen: 5 µl

Ionisierung: negativ

Messbereich: 120-1000 m/z

LC-MS von Pflanzenproben:

Die Gersten-Proben wurden am LTQ FT MS gemessen. Um über einen breiten Bereich empfindlich messen zu können, wurde der zu messende Massenbereich in drei Teile aufgeteilt. Dadurch wurden Flugzeiteffekte beim Transfer von LIT zum ICR-Teil minimiert und damit eine bessere Empfindlichkeit über den Massenbereich erreicht.

Im Vergleich zur Messung der Standards am LCQ-Deca-Gerät wurden die Geräteeinstellungen möglichst genau an die Gegebenheiten des Gerätes adaptiert. Aufgrund der hohen Probenanzahl wurde der Gradient verändert, verkürzt und steiler gemacht. Bedingungen wie pH-Wert und Pufferkonzentration wurden beibehalten. Es wurden folgende Trennbedingungen gewählt:

Laufmittel: A) 95:5 H₂O/ACN mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5

B) 5:95 H₂O/ACN mit 10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5

Flussrate: 125 µL/min

Trennsäule: Zic-HILIC; 2,1x150 mm

Gradient:	min	A (%)	B (%)
	0	0	100
	1	0	100
	25	75	25
	30	75	25
	31	0	100
	45	0	100

Injektionsvolumen: 10 μ L
Messbereiche: 65-175 m/z
150-500 m/z
475-1000 m/z
Quellenspannung: 5,02 kV
Kapillarspannung: -23,13 V
Gase: Helium, Stickstoff
Temp. (Transferkapillare): 275 °C

Bei den Messungen der Modellmischungen wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, nach 6 Proben wurde jeweils ein Blindwert gemessen.

Von den biologischen Proben wurden Einfachbestimmungen der fünf in den biologischen Experimenten erzeugten Replikate durchgeführt. Nach je fünf Messungen (jeweils nach einem zusammengehörigen Probenblock) folgte ein Blindwert.

Die Reproduzierbarkeit wurde wegen der großen Probenanzahl und der geringen Probenmenge nicht für jede einzelne Probe, sondern exemplarisch anhand von vier Proben in Fünffachmessungen nachgewiesen.

5.2.5 Kapillarelektrophoretische Trennung

Die Messungen mit Kapillarelektrophorese wurden in einer Fused-Silica-Kapillare durchgeführt. Die Gesamtlänge der Kapillare betrug 51 cm (Länge zum UV-Detektor 38,5 cm, Länge zum C⁴D 31,5 cm). Der Innendurchmesser der Kapillare betrug 50 μ m. Als Puffer wurde eine Lösung aus 20 mmol/l MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) und 20 mmol/L Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) verwendet, die auf einen pH-Wert von 7,1 eingestellt war. Für die Fokussierung wurde eine Spannung von 15 kV angelegt.

Die Kapillare wurde zur Konditionierung täglich für 10 min mit 0,1 mol/L Natronlauge gespült, danach für 10 min mit Wasser und anschließend für 30 min mit MES/Tris-Puffer equilibriert. Vor den Trennungen wurde die Kapillare für 3 min mit 0,1 mol/L Natronlauge, für 4 min mit Wasser und für 5 min mit Puffer gespült.

Die Proben wurden vor dem Lauf im Verhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt.

5.2.6 Auswertung der Rohdaten

Auswertung – Target-Analyse (Xcalibur)

Für die Auswertung der LC-MS-Daten mit Xcalibur wurden folgende Parameter gewählt: Bei Messungen mit dem LTQ-FT Massenspektrometer wurde eine maximale Abweichung von 5 ppm für die m/z-Werte angegeben. Für die Messungen am LCQ-Deca-Massenspektrometer wurde die maximale Abweichung mit 250 mmu angegeben. Wegen der unvermeidlichen Ungenauigkeiten bei einer automatischen, softwaregestützten Flächenauswertung, insbesondere bei Peaks nahe der Nachweisgrenze, wurde die Basislinie der auszuwertenden Peaks manuell festgelegt. Als weitere Voraussetzung für die Identifizierung diente das Isotopenmuster, das mit der Software simuliert und mit der gemessenen Verteilung verglichen wurde.

Bei den Messungen der Eisen-Citrat- und der Kupfer-Histidin-Standards wurden die detektierten Signale mit Xcalibur geglättet (3-7 pt). Die Standards wurden mit jeweils drei Wiederholungen gemessen. Die Triplikate wurden für die statistische Auswertung zu einem Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung bestimmt.

Bei den biologischen Proben wurden die vorhandenen fünf Replikate eines Ernährungszustandes für die Auswertung gemittelt und die dazugehörige Standardabweichung bestimmt.

Auswertung – Non-Targeted Analyse (MZmine)

Es wurden folgende Parameter für die Auswertung mit MZmine vorgegeben:

Tabelle 4: MZmine-Parameter zur Auswertung der gemessenen Probenreihe

Parameter	Wert
Chromatogramm builder	
Mass resolution	40000
	Gaussian
Noise level	1,00 E1
Min time span (min)	0:20
Min height	1,00 E2
m/z tolerance	0,002

Join Aligner	
m/z tolerance	0,002
Weight for m/z	60
Ret. time tolerance	Absolute
Absolute ret. time tolerance	0:30
Rel. ret. time tolerance	15%
Weight for ret. time	10
ID	0
Isotope pattern score	15%
Weight for isotope pattern	10

Die Werte der Parameter orientierten sich an den Werten, die für die schon bekannten Signale zutreffend waren. Dafür wurden die mit Xcalibur ausgewerteten Signale betrachtet. Es wurde manuell sichergestellt, dass die Erkennung der chromatographischen Signale korrekt war, also wenn der Anteil der erkannten Signale zu 80-90% korrekt war.

6 Ergebnisse und Diskussion

Metalle kommen in Pflanzen in sehr geringer Konzentration vor, was für die Analytik eine große Herausforderung darstellt. Zudem sind die Metalle in Form von nicht-kovalenten Komplexen gebunden, die unbekannte Stabilitäten besitzen. Jede (Vor-)Trennoperation bringt die Verschiebung von Gleichgewichten mit sich, die zur Änderung von Stöchiometrien führen kann, bis hin zur Dissoziation der Komplexe (Abbildung 3, S. 30). Je nach Probe ist es in vielen Fällen aber notwendig, die Metallkomplexe vor der Analyse zu konzentrieren bzw. anzureichern. Problematisch ist dabei neben der Stabilität der Komplexe die Komplexizität der Matrix in Pflanzenproben. Ein Lösungsansatz für diese Problematik wird in Kapitel 6.1 vorgestellt.

Für die Beantwortung biologischer Fragestellungen mit Metallaufnahme, -transport oder -verteilung ist eine Trennung und Identifizierung möglichst aller Metallkomplexe notwendig. Eine besondere Herausforderung ist dabei wegen der Gefahr von Speziesänderungen durch Gleichgewichtsverschiebungen (s.o.) die Trennung labiler Spezies. Die Analyse solcher labilen Spezies wird in Kapitel 6.2 vorgestellt, und die Anwendung des entwickelten Analyseverfahrens auf eine konkrete biologische Fragestellung wird in Kapitel 6.3 dargelegt.

6.1 Trennung von Metallspezies mit IEF

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) ist ein Trennverfahren, das amphotere Substanzen nach ihrem Isoelektrischen Punkt trennt und innerhalb eines pH-Gradienten an diesem pI anreichert. IEF ist ein Standardverfahren der Proteinanalytik, für kleine Moleküle wird sie kaum verwendet. Die Anwendung des IEF-Prinzipes auf nicht kovalente Metallkomplexe ist somit ein völlig neuer Ansatz, denn es ist nicht bekannt,

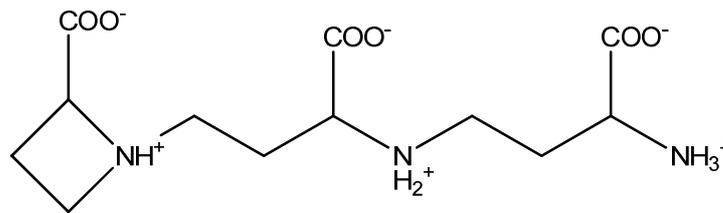
- I) ob solche Metallkomplexe überhaupt einen pI -Wert besitzen
- II) ob die Stabilität der Metallkomplexe ausreichend für den Fokussierungsprozess ist

Gundlage und Motivation für die systematische Untersuchung der Fokussierbarkeit von Metallspezies waren folgende Überlegungen:

1. bei einigen der wichtigsten pflanzlichen Metall-Liganden, die bisher identifiziert

wurden, handelt es sich um amphotere Verbindungen (z.B. Nicotianamin, s. Abbildung 13)

- Die funktionellen Gruppen, die für die amphoteren Eigenschaften der Liganden verantwortlich sind, sind gleichzeitig auch für die Metallbindung verantwortlich. Folglich wird durch die Metallbindung auch die Fokussierbarkeit beeinflusst.
- Falls Metallspezies tatsächlich fokussierbar sind, ergeben sich deutliche Vorteile gegenüber anderen möglichen Anreicherungstechniken (z. B. Ionenaustausch, Extraktion): zum einen die methodeninhärente Anreicherung der Analyten, zum anderen die gleichzeitige Abtrennung vieler nicht-amphoterer Matrixbestandteile (Kationen, Anionen).



pK	pK1	pK2	pK3	pK4
NA	10,09	9,14	6,92	2,86

Abbildung 13: Zwitterionische Struktur von Nicotianamin (NA) und pK-Werte [29]

Zur Klärung der Frage, ob Metallkomplexe mit IEF fokussiert werden können, wurde ein Rotofor-System verwendet. Ein wässriges System unter Verwendung löslicher Carrier-Ampholyte (CA). Dabei handelt es sich um ein semipräparatives System, das im Gegensatz zur kapillaren IEF (cIEF) den direkten Zugriff auf diese Fraktionen erlaubt. Das hat den Vorteil, dass die einzelnen Fraktionen mit mehreren Analysemethoden parallel untersucht werden können. Zum Beispiel erlaubt es eine AAS-Bestimmung der Metallgehalte und eine exakte pH-Bestimmung.

6.1.1 Stabilität und Fokussierbarkeit von Metallkomplexen

Um die Anwendbarkeit der IEF für Metallkomplexe zu untersuchen, wurden drei Metall-Liganden-Systeme ausgewählt, die eine ansteigende thermodynamische Stabilität der jeweiligen Metallkomplexe besitzen (s. Tabelle 5).

Als erstes Beispiel (für Komplexe mit niedriger Stabilität, s. Tabelle 5) wurde ein Gemisch aus Kupfer und Histidin der IEF unterzogen. Kupfer wurde ausgewählt, da es (im Vergleich der Metalle) die stabilsten Komplexe bilden sollte und damit die besten Voraussetzungen gegeben sind, die in der Mischung vorliegenden Komplexe stabil zu fokussieren. Histidin gehört zu den Liganden, denen in Pflanzen eine Rolle bei der Komplexbildung von Metallen zugeschrieben wird. Daher ist die Kupfer-Histidin-Mischung ein interessantes Beispiel für Metallkomplexe mit einzelnen Aminosäuren.

Als zweites Beispiel wurde eine Mischung aus reduziertem Glutathion und Kupfer verwendet. GSH bildet Komplexe mit mittlerer thermodynamischer Stabilität (z.B. $\log K [\text{Zn(II) GSH}]^{2-} = 14,7$ [111]) (s. Tabelle 5). GSH spielt bei vielen Redoxvorgängen eine wichtige Rolle.

Als Beispiel für Komplexe mit hoher thermodynamischer Stabilität wurde Eisen mit EDDHA (Ethyldiamin-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetat)) verwendet. Dabei handelt es sich um einen synthetischen und bioverfügbaren Liganden, der als stabiler Chelatbildner zur Komplexbildung von Eisen in Düngern eingesetzt wird [112-115]. EDDHA ist für die Ausbildung von 1:1-Komplexen bekannt. Das hier untersuchte Fe(III)-o,o-EDDHA besitzt eine hohe thermodynamische Stabilität von 10^{35} [114, 116]

Tabelle 5: Stabilitätskonstanten von Metall-Komplexen

Komplex	pK-Wert
Cu(II)His	10,1 [117]
Zn(II)GSH	14,7 [111]
Cu(II)GSSG	3,6 [118]
Fe(III)-o,o-EDDHA	35 [114]

Ein wichtiger Punkt, der bei der Anwendung von IEF in wässrigem Medium zu beachten ist, ist die Anwesenheit von löslichen Carrier-Ampholyten (CA), die in hohen Konzentrationen in der Lösung vorhanden sind, um einen pH-Gradienten auszubilden. Bei den Carrier-Ampholyten handelt es sich um ein Gemisch

synthetisierter Poly-Amino-Poly-Carboxylat-Verbindungen, die je nach Marke und pH-Bereich der Ampholytlösungen aus vielen hunderten Einzelkomponenten bestehen [119-123]. Die genaue Struktur und Identität der einzelnen Komponenten ist nicht bekannt, doch mit ihren Amino- und Carboxylgruppen stellen die CA eine Konkurrenz zu den Liganden dar, was die Komplexierung der Metalle angeht, und über die Stabilität von CA-Komplexen ist nichts bekannt. Es ist daher notwendig sicherzustellen, dass die CA selbst unter den gewählten Trennbedingungen keine Komplexe mit eigenem pI -Wert mit den Metallen bilden, bevor die Modellmischungen der IEF unterzogen werden.

Um das Verhalten der CA mit Metallen zu überprüfen, wurde die IEF zunächst nur mit Kupferionen in Abwesenheit von Liganden durchgeführt. Für die Fokussierung wurden 2% CA eingesetzt, was der empfohlenen Menge für Proteinanwendungen entspricht. Wenn die CA unter den angewendeten Bedingungen keine fokussierbaren Komplexe mit dem Kupfer bilden, sollte das Kupfer zur Kathodenseite der Trennkammer migrieren.

Die IEF des reinen Kupferstandards im pH-Bereich von 3-10 (Abbildung 14) zeigt deutlich, dass sich der überwiegende Teil des Kupfers (>60%) erwartungsgemäß an der Kathode findet. Geringe Mengen Kupfer sind auch bei niedrigeren pH-Werten zu finden und nehmen in Richtung der Kathode zu. Das könnte auf die bei steigendem pH-Wert zunehmende Anzahl der Aminogruppen in den CA und die Bindung des freien Kupfers an diese Gruppen zurückzuführen sein. Da jedoch keine Fokussierung stattfindet, entstehen keine stabilen Komplexe des Kupfers mit den CA, die einen eigenen pI -Wert besitzen. Somit eignen sich die gewählten Trennbedingungen für die weiteren Untersuchungen der Liganden und falsch positive Ergebnisse durch CA-Komplexe sind auszuschließen.

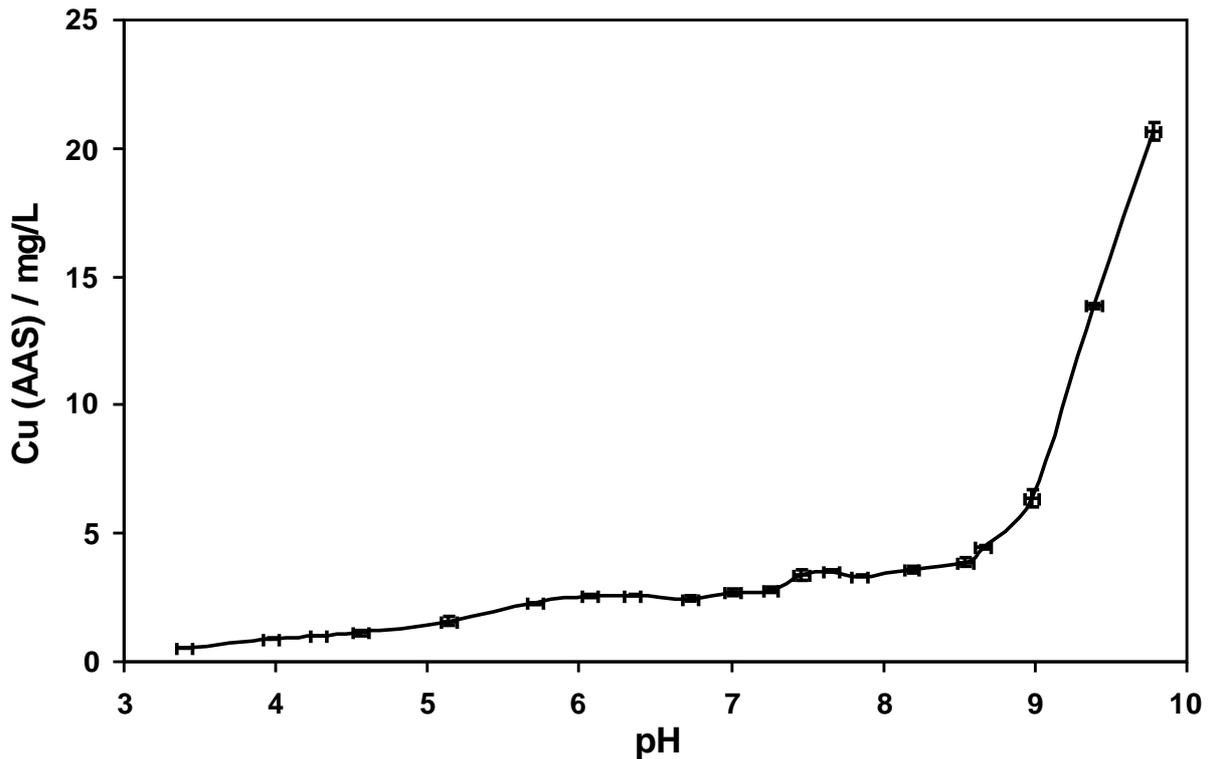


Abbildung 14: Fokussierung eines 100 mg/l Kupferstandards (mit 2% Bio-Lyte 3-10, 12 W, 50 min); Mittelwert aus zwei Messungen

Nachdem klar ist, dass die CA keine stabilen Komplexe mit Kupfer bilden, werden die drei oben erläuterten Beispiele für Komplexe mit niedriger, mittlerer und hoher thermodynamischer Stabilität auf ihr Fokussierungsverhalten hin untersucht. Zunächst wird Kupfer-Histidin der IEF unterzogen. Dabei liegt das Histidin im Überschuss vor, so dass das Kupfer in der Modellmischung vollständig komplexiert vorliegen sollte. Die Darstellung der 20 IEF-Faktionen (s. Abbildung 15) zeigt eine Kupferverteilung, die nahezu identisch ist mit der Migration freier Kationen (s. Abbildung 14). Die beste Erklärung für dieses Ergebnis ist eine nahezu vollständige Dissoziation der vorliegenden Cu-Histidin-Komplexe während der Fokussierung. Die einzige andere Erklärungsmöglichkeit wäre das Vorliegen von kationischen Cu-His-Komplexen auch noch bei pH 9-10, was aber auf Grund der pK-Werte von His und der bisher beschriebenen Strukturen von Cu-His-Komplexen [118, 124-127] sehr unwahrscheinlich ist. Das Kupfer-Histidin ist also vollständig dissoziiert, somit ist die Stabilität nicht ausreichend für die Fokussierungsbedingungen.

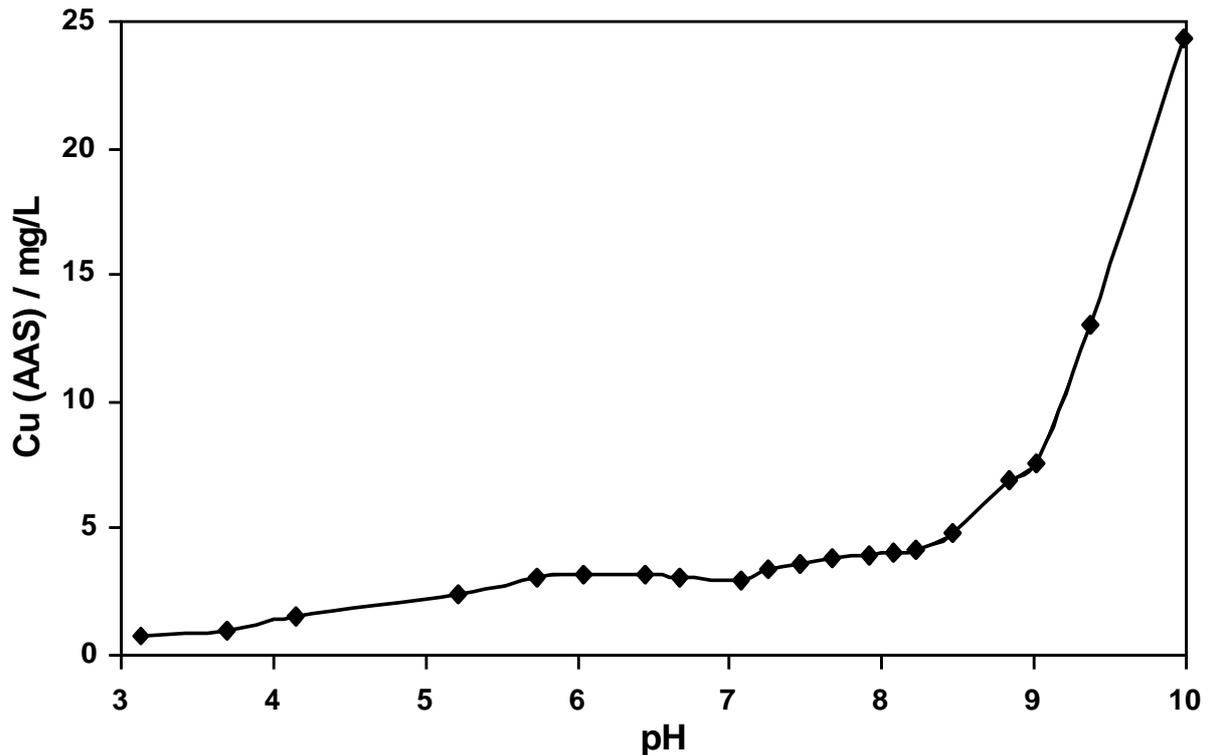


Abbildung 15: Fokussierung eines Standards mit 150 mg/L Kupfer und 1 g/L Histidin (mit 2% Bio Lyte 3-10, 12 W, 50 min); Mittelwert aus zwei Messungen

Die Modellmischung mit der nächsthöheren Stabilität ist die von reduziertem Glutathion (GSH) und Kupfer. GSH (pK1: 2,12; pK2: 3,53; pK3: 8,66; pK4: 9,12) ist in Zellen in großen Mengen vorhanden und spielt bei Redox-Vorgängen eine wichtige Rolle. Es dient als Substrat zur Produktion von Phytochelatinen, die als wichtige Schwermetallchelatoren in Pflanzen bekannt sind [128] und ist ein möglicher Ligand für Metallkationen in Pflanzen.

Das Ergebnis der IEF einer Kupfer-Glutathion-Modellmischung im Vergleich zu freiem GSH ohne Metalle ist in Abbildung 16 zu sehen. Das freie Glutathion fokussiert etwa bei einem pH-Wert von 4. Die Kupferverteilung des Cu(II)-GSH-Gemisches (1:1) zeigt drei Peaks. Der erste liegt im pH-Bereich zwischen 3 und 4, der zweite im Bereich von 6. Der dritte ist auf der Kathodenseite, was charakteristisch für das Migrationsverhalten von freiem Kupfer ist (s. Abbildung 14). Eine Bestimmung der absoluten Kupfermengen zeigt, dass ca. 45 % des Kupfers nach der Fokussierung in Komplexen gebunden vorliegt (20 % im ersten Peak, 25 % im zweiten Peak). Bei den 55 % im dritten Peak handelt es sich wahrscheinlich um freies Kupfer.

Die zwei fokussierten Peaks stellen zwei Kupfer-Glutathion-Komplexe dar, die sich

durch unterschiedliche Stöchiometrien und/oder den Ladungszustand unterscheiden, der zu den zwei unterschiedlichen *pI*-Werten führt.

Eine Möglichkeit zur Erklärung des freien Kupfers ist die Bildung von zwei stabilen Cu(II)-Komplexen mit unterschiedlichen Stöchiometrien und mindestens einem instabilen Komplex, der einer Dissoziation unterliegt. Es besteht die zweite Möglichkeit, dass zwei Cu(II)-Komplexe gebildet wurden, die während der IEF fokussieren, aber dabei teilweise dissoziiert sind.

Bei den zwei stabilen Cu-Komplexen kann es sich nach den bisher bekannten Vorstellungen um einen Cu(I)-GSH-Komplex und um einen Cu(II)-GSSG-Komplex handeln, denn es ist bekannt, dass Cu(II) von GSH bei pH 7,4 zu Cu(I) reduziert wird ($2 \text{ Cu}^{2+} + 2 \text{ GSH} \rightarrow 2 \text{ Cu}^+ + \text{GSSG} + 2 \text{ H}^+$), was mit GSH einen Cu(I)-GSH-Komplex bildet [129]. Allerdings können auch andere als die bisher beschriebenen Stöchiometrien nicht ausgeschlossen werden.

Auch wenn die genaue Identität der Komplexe nicht bekannt ist, konnte aber gezeigt werden, dass es mindestens zwei fokussierbare Metallkomplexe gibt, die den Prozess der IEF stabil überstehen. Auch konnte hier bereits nachgewiesen werden, dass unterschiedliche Metallkomplexe sich in ihrem *pI*-Wert voneinander unterscheiden und sich anders verhalten als der freie Ligand.

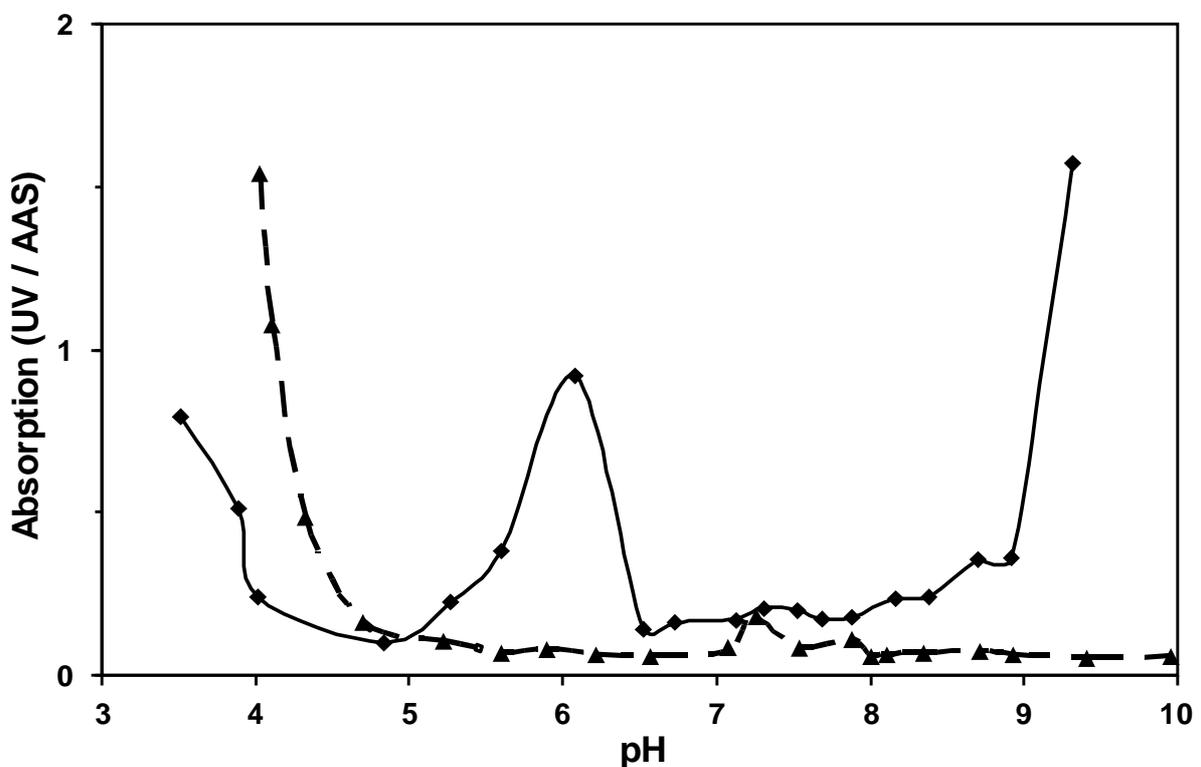


Abbildung 16: Fokussierung eines Kupfer-Glutathion-Standards (1:1) (—■— Cu (AAS)), im Vergleich mit freiem GSH (—▲— GSH (UV))

Daher wurden im dritten Schritt EDDHA (Ethylendiamin-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetat)) und seine Komplexe verwendet, um detailliertere Untersuchungen zum Trennverhalten durchzuführen. Insbesondere war zunächst die Frage zu klären, ob der thermodynamisch stabile Fe(III)-Komplex ohne Dissoziation fokussiert wird. EDDHA ist für die Ausbildung von ausschließlich 1:1-Komplexen bekannt, und das hier untersuchte Fe(III)-o,o-EDDHA besitzt eine hohe thermodynamische Stabilität von 10^{35} [114, 116]. EDDHA existiert generell als o,o-, o,p- und p,p-Form. Da die p,p-Form durch sterische Hinderung keine Metallkationen komplexiert, wird in Düngern nur die o,o- und o,p-Form angewendet [112]. Die o,o-Form ist die stabilste, da aus sterischen Gründen nur hier eine Koordination des Metallkations durch alle sechs funktionellen Gruppen möglich ist (zwei Carboxygruppen, zwei Aminogruppen und zwei Hydroxydgruppen) [113-114, 116, 130]. Ein weiterer Vorteil bei der Wahl des EDDHA-Systems ist, dass Fe(III)-EDDHA einen tiefroten Komplex bildet, der nicht nur eindeutig mit DAD-Detektion bestimmt werden kann (Absorptionsmaximum bei 480 nm), sondern auch eine visuelle Beobachtung des Fokussierungsprozesses erlaubt (was im Rotofor-System gut möglich ist).

Abbildung 17 zeigt die IEF von Fe(III)-EDDHA im Vergleich zur IEF vom freien Liganden. Die Eisenverteilung bei der IEF von Fe(III)-EDDHA bestätigt, dass das gesamte Eisen sich im Peak des Komplexes befindet, also an EDDHA gebunden ist. Die Herstellung der Komplexe wurde bei kontrolliertem pH durchgeführt. Bei der IEF kommen die Komplexe nur mit pH-Werten in Verbindung, die zwischen dem Ausgangs-pH und ihrem pI-Wert liegen. Somit ist eine Dissoziation durch extreme pH-Bedingungen ausgeschlossen. Die Stabilität der Komplexe wurde durch die Quantifizierung nach der IEF überprüft. Im Gegensatz zu den Kupfer-Komplexen von GSH und Histidin findet sich kein messbares Eisen im Bereich der Kathode. Der Komplex ist also auch nach der IEF intakt und unterliegt keinerlei Dissoziation. Der freie Ligand fokussiert im Bereich von pH 4. Das passt gut zu den pK_S -Werten, denn die pK_S der Carboxylgruppen sind etwa im Bereich von 2, die der Aminogruppen oberhalb von 6 (6,16; 8,58 [114]). Theoretisch ergibt sich daraus ein pI von etwa 4,2, allerdings ist eine genaue Kalkulation des pI -Wertes von EDDHA nicht möglich, da die pK_S -Werte der zwei Carboxylgruppen wegen Problemen mit der Löslichkeit des Liganden nicht exakt bestimmbar sind ([116]). Eine genaue Bestimmung des pI -

Wertes mit IEF ist durch die geringe Auflösung des semipräparativen Maßstabes nicht möglich (nur 20 Fraktionen für den pH-Bereich von 3-10). Es lässt sich jedoch festzustellen, dass sich der Eisenkomplex in seinem Fokussierungsverhalten stark vom freien Liganden unterscheidet. Der Komplex findet sich am Anodenende der Trennkammer. Damit liegt der Peak in einem pH-Bereich außerhalb des durch die Carrier-Ampholyte gepufferten Bereiches, weshalb mit dieser Methode noch nicht eindeutig geklärt wurde, ob es sich um Fokussierung oder Migration zur Anode handelt. Diese Frage wird durch Einsatz eines cIEF-Systems in Kapitel 6.1.4 geklärt.

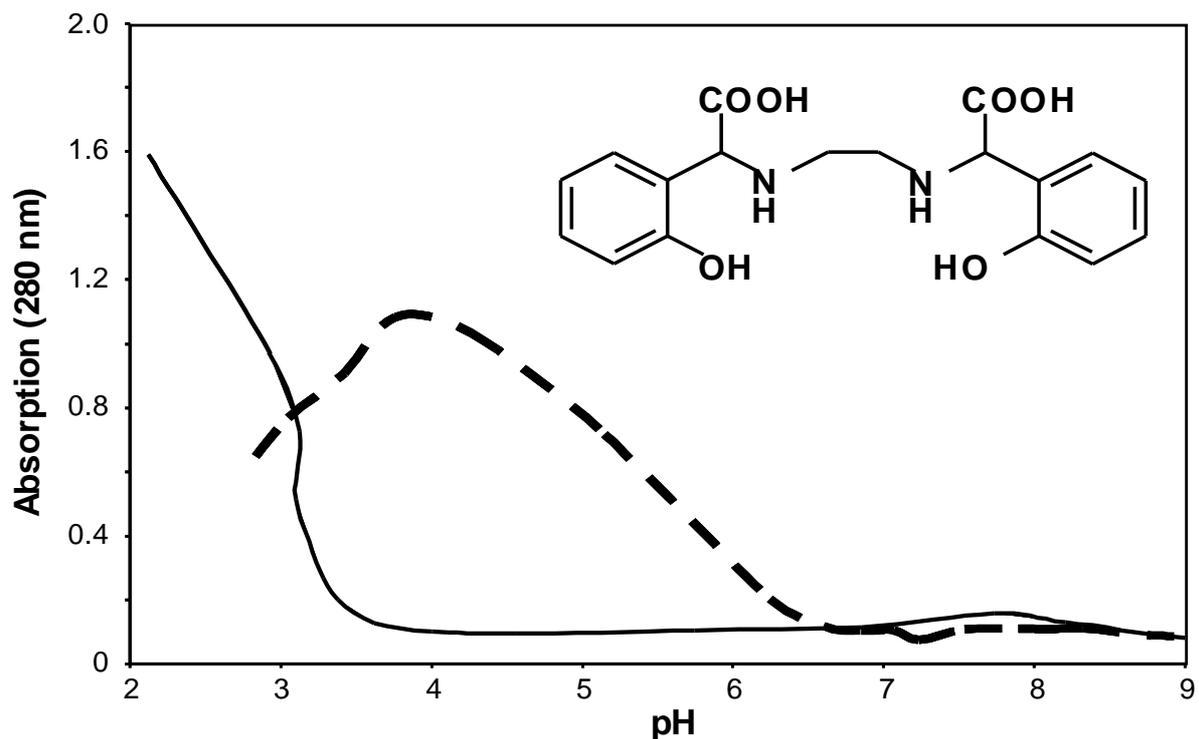


Abbildung 17: Fokussierung von $---$ EDDHA (freier Ligand) und $---$ 1:1 Fe(III)-EDDHA-Komplex; Detektion mit DAD (Fe(III)-EDDHA: 480 nm; EDDHA: 280 nm)

EDDHA komplexiert sowohl zwei-, als auch dreiwertige Metallkationen. Es existieren jedoch keine Informationen darüber ob das Fokussierungsverhalten von Komplexen in der IEF mit anderen drei- oder zweiwertigen Metallkationen von dem des Fe(III)-EDDHA abweicht. Der pI-Wert von Komplexen mit zweiwertigen Metallkationen sollte sich aufgrund der unterschiedlichen Gesamtladung vom dem der Komplexe mit dreiwertigen Metallkationen unterscheiden. Die Trennbarkeit unterschiedlicher Komplexe ist von Interesse, da auch pflanzliche Liganden (PS, NA) zwei- und dreiwertige Metallkationen komplexieren können.

Zur Untersuchung von Komplexen mit dreiwertigen Metallen wurde neben Fe(III)

Ga(III) und Al(III) verwendet. Gallium besitzt ähnliche Eigenschaften wie Eisen, ist jedoch nicht redoxaktiv. Aluminium wird von Pflanzen aufgenommen und ist toxisch. Das Trennverhalten von Komplexen mit zweiwertigen Metallkationen wird anhand von Zn(II)- und Ni(II)-EDDHA untersucht. Zink ist eines der wichtigsten in Pflanzen benötigten Metalle. Genau wie Ni(II) bildet Zn(II) stabile Komplexe und ist dabei nicht redoxaktiv (im Gegensatz zum Kupfer).

Die IEF der unterschiedlichen Me-EDDHA-Komplexe lässt eine deutliche Abhängigkeit der pI-Werte von der Wertigkeit der gebundenen Kationen erkennen. (Abbildung 18). Die EDDHA-Komplexe mit dreiwertigen Kationen (Ga(III), Fe(III) und Al(III)) zeigen ein sehr ähnliches Verhalten, das vorher schon für den Fe(III)-Komplex festgestellt wurde. Alle drei Komplexe fokussieren außerhalb des gepufferten pH-Bereichs etwa bei pH 2-3. Während die Fokussierung des Ga(III)- und Fe(III)-Komplexes einander sehr ähneln, ist die Al-Kurve breiter.

Der pI-Wert der Komplexe mit zweiwertigen Kationen (Zn(II) und Ni(II)) liegt in einem ähnlichen Bereich von pH 3,5 – 4,5 und damit im gleichen pH-Bereich wie der pI des freien Liganden. Bei der IEF des Zn(II)-EDDHAs ist eine leichte Schulter vor dem Hauptpeak zu sehen, beim Ni(II)-EDDHA nach dem Hauptpeak. Es ist naheliegend, dass es sich um jeweils zwei Komplexe handelt, die mit der verwendeten Auflösung nicht getrennt wurden.

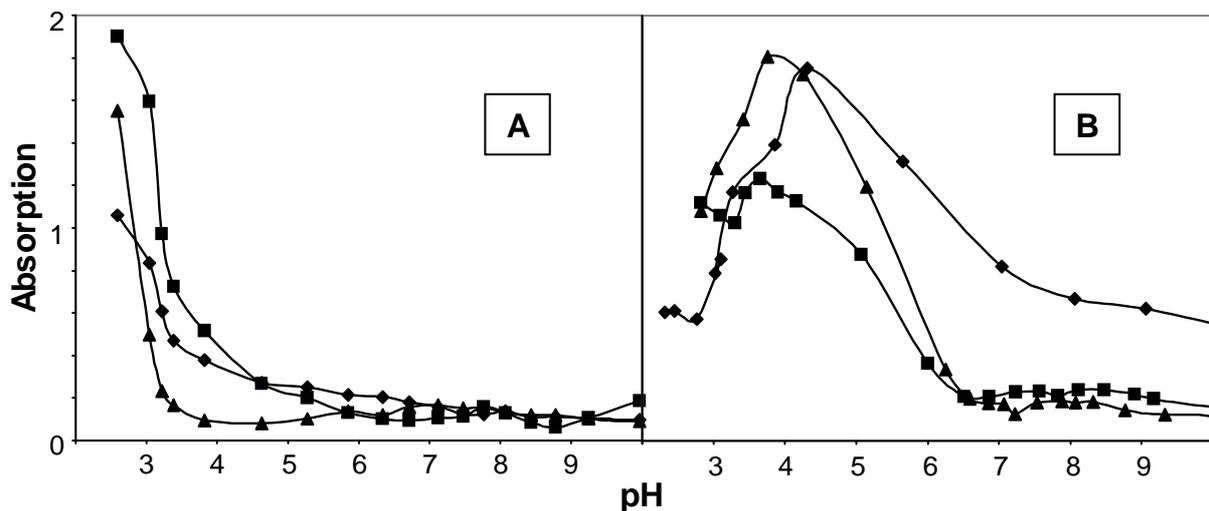


Abbildung 18: Fokussierung von A) EDDHA-Komplexen mit dreiwertigen Metallionen (▲ Ga-EDDHA ■ Fe-EDDHA ◇ Al-EDDHA) und B) EDDHA (▲) und EDDHA-Komplexen (◇ Zn-EDDHA ■ Ni-EDDHA) mit zweiwertigen Metallionen (Fe(III)-EDDHA: 480 nm; Andere: 280 nm)

Die Breite der Peaks in der IEF kann zum einen auf die geringe Auflösung der semipräparativen IEF zurückzuführen sein. Zum anderen kann sie auch dadurch erklärt werden, dass das o,o-EDDHA nur mit einer 86,3 %igen Reinheit erhältlich ist und gegebenenfalls o,p-Isomere enthält, die ebenfalls Komplexe bilden können und diese sich nur minimal im pI von den o,o-Isomeren unterscheiden [112].

In der IEF von EDDHA-Komplexen mit unterschiedlichen zwei- und dreiwertigen Metallkationen wurde gezeigt, dass sowohl die dreiwertigen als auch die zweiwertigen Komplexe während der Fokussierung stabil sind und dass verschiedene Metallkomplexe voneinander trennbar sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Metallkomplexe mit IEF fokussierbar sind. Die verwendeten CA stören die Trennung nicht, da sie keine stabil fokussierbaren Komplexe mit Metallen bilden. Metallkomplexe mit Aminosäuren sind nicht stabil genug für den IEF-Prozess. In der Cu(II)-Modellmischung lassen sich zwei Komplexe stabil fokussieren, jedoch liegt auch noch freies Kupfer vor, das entweder auf mindestens einen weiteren, instabilen Komplex hindeutet oder darauf, dass die fokussierten Komplexe einer teilweisen Dissoziation unterliegen. Die IEF der thermodynamisch stabilen EDDHA-Komplexe erbrachte detailliertere Erkenntnisse zu den Unterschieden im Fokussierungsverhalten der Komplexe mit verschiedenen Metallen. Die Komplexe mit dreiwertigen Metallen unterscheiden sich in ihrem pI stark vom freien Liganden und von den EDDHA-Komplexen mit zweiwertigen Metallen, die in einem ähnlichen Bereich wie der freie Ligand liegen.

Zwei Aspekte konnten bei den verwendeten Bedingungen noch nicht eindeutig geklärt werden.

- I) Im verwendeten pH-Bereich ist nicht eindeutig zu entscheiden, ob die Me(III)-Komplexe einen eindeutigen pI-Wert ($pI < 3$) besitzen oder zur Anode migrieren.*
- II) Die geringe Auflösung des verwendeten Maßstabes ermöglicht keine genaue pI-Bestimmung. Daher kann auch keine Aussage über die relative Lage der pI-Werte von freiem EDDHA und die der entsprechenden Me(II)-Komplexe getroffen werden.*

Beide Aspekte wurden im weiteren Verlauf der Arbeit durch Anwendung der cIEF geklärt (Kapitel 6.1.4).

Stabilität in Bezug auf das elektrische Feld:

Um die Stabilität des Fe(III)-EDDHA-Komplexes auch unter extremeren Fokussierungsbedingungen zu beweisen, wurde die Fokussierungszeit auf zwei Stunden verlängert. Doch genauso wie die Erhöhung der Leistung auf 25 W hatte dies keinen negativen Effekt auf die Stabilität des Komplexes. Die Wiederfindung des Fe(III)-Komplexes betrug in allen Fällen mehr als 90 %. Dies wurde mithilfe des Metallgehaltes und des Volumens der Fraktionen gemessen.

6.1.2 Fokussierung von DMA und Fe(III)-DMA

Die Fokussierbarkeit von nicht-kovalenten Metallkomplexen in der IEF wurde bereits am Beispiel von EDDHA-Komplexen nachgewiesen. Bei der Untersuchung von Cu-Histidin und Cu-GSH wurde jedoch deutlich, dass der Stabilität der Komplexe eine Schlüsselrolle zukommt. Es bleibt zu klären, ob die bisher gewonnenen Erkenntnisse auch für natürlich in Pflanzen vorkommende Metallverbindungen zutreffen und ob die Matrix von Pflanzenproben einen Einfluss auf die Fokussierbarkeit oder die Stabilität der Komplexe hat.

Einer der wichtigsten bekannten Eisenliganden ist das DMA. Die Stabilität des Fe(III)-DMA-Komplexes ist bereits bekannt und mit 10^{18} - 10^{25} hoch [13], wenn auch niedriger als die des EDDHA-Komplexes (10^{35} s. oben). Darüber hinaus existieren bereits Trennverfahren für DMA und Fe(III)-DMA auf Basis von HPLC [113, 130-131] und CE [67].

Für die Detektion von DMA, bzw. des Fe-DMA musste die Detektion angepasst werden. In den vorhergegangenen Untersuchungen wurde die IEF bereits mit UV-Detektion und elementspezifischer AAS-Detektion gekoppelt, was für die eindeutige Identifizierung der Analyten und Unterscheidung von CA ausreichend war. Bei der Detektion von DMA bzw. Fe(III)-DMA ist die bisher verwendete Detektion nicht ausreichend. Um eine Aussage über die Identitäten zu treffen, wurde daher eine MS-Detektion verwendet, da diese eine eindeutige Identifizierung der Analyten bietet (Isotopenmuster, m/z, etc.). Aber auch bei MS muss beachtet werden, dass die Anwesenheit der CA die Identifizierung behindert.

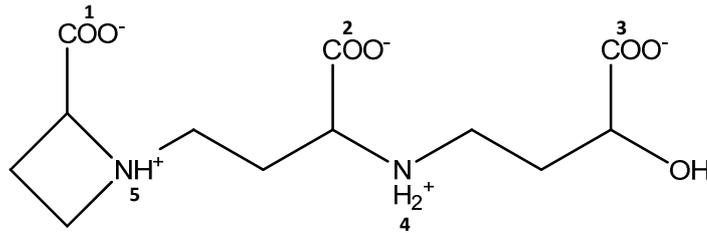
Da die Gemische eine große Anzahl von Verbindungen beinhalten, die auch im gesamten Massenbereich des Liganden und des Komplexes zu finden sind, können Störungen durch Überlagerung nicht ausgeschlossen werden. Um eine eindeutige Identifizierung zu gewährleisten, wurde die Detektion mit MS³ durchgeführt. Dabei

wurden das Fe(III)-DMA und das freie DMA anhand von charakteristischen Fragmenten in der Detektion identifiziert.

In Abbildung 20 ist die Fokussierung einer DMA-angereicherten Pflanzenprobe abgebildet. In den Fraktionen wurde sowohl Fe(III)-DMA als auch der freie Ligand parallel mit MS³ detektiert. Für Fe(III)-DMA wurden im MS² und MS³ die Fragmente m/z=312,0 (entspricht der Abspaltung von CO₂ von [M-H]⁻ mit m/z=356,0) und 268,0 (entspricht einer weiteren Abspaltung von CO₂ vom m/z=312,0-Fragment) verwendet. Für das freie DMA mit m/z=303,1 wurden die charakteristischen Massenfragmente m/z=285,1 (entspricht der Abspaltung eines Moleküls H₂O) und m/z=183,0 zur Identifizierung verwendet.

Zusätzlich zur massenspektrometrischen Detektion wurde die Verteilung des Eisens in den Fraktionen mit AAS kontrolliert. Die Übereinstimmung der Verteilung des Gesamteisens mit der Verteilung des Fe(III)-DMA-Komplexes beweist, dass das in der Probe befindliche Eisen in Form des DMA-Komplexes vorliegt und dass dieser stabil in der Fokussierung ist. Der Fe(III)-Komplex fokussiert, wie auch der EDDHA-Komplex, außerhalb des durch die CA gepufferten Bereiches etwa bei pH 2. Das freie DMA wird bei einem pH-Wert von etwa 3 fokussiert. Dieser Wert stimmt mit den Annahmen überein, die auf den pK_a-Werten für DMA basieren [13]. Danach müssen für eine Gesamtladung von 0 die beiden Stickstoffatome protoniert sein, während zwei der drei Säuregruppen deprotoniert sind (s. Abbildung 19). Damit sollte der pI-Wert etwa bei 2,7 liegen (zwischen 1,94 und 3,42), was mit dem bestimmten Bereich von ca. 3 übereinstimmt. Der pI-Wert des Eisen-Komplexes ist geringer als der des freien DMA. Das entspricht Computersimulationen zu Speziesverteilungen, die einen neutralen Fe-DMA-Komplex in einem pH-Bereich ab 2,5 vorhersagen [29].

Somit wurde gezeigt, dass die semipräparative IEF nicht nur für synthetische Komplexe, sondern auch für den Eisenkomplex mit DMA (als ein Beispiel für PSe) anwendbar ist. Die MS-Detektion stellte hier eine eindeutige Identifizierung trotz der CA sicher.



pK	pK1	pK2	pK3	pK4	pK5
DMA	<1,5	1,94	3,42	9,12	9,66

Abbildung 19: Struktur und pK-Werte von DMA (Deoxymugineinsäure)[13]

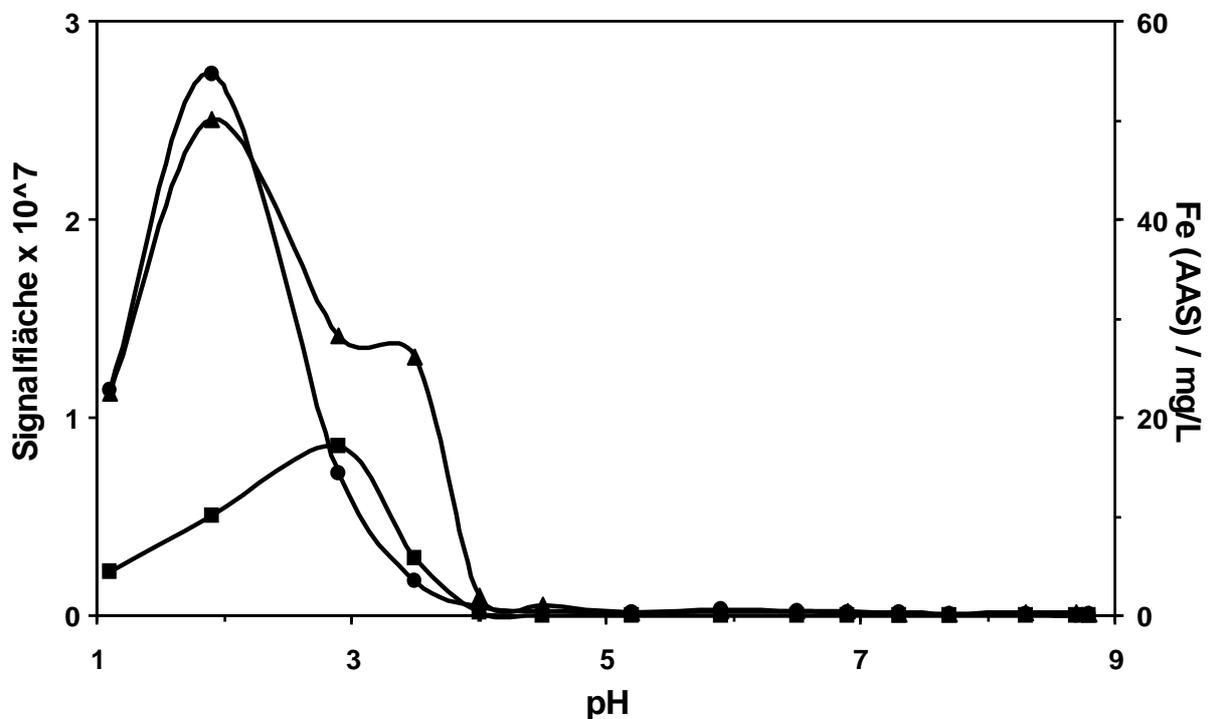


Abbildung 20: Fokussierung einer DMA-haltigen Pflanzenprobe; ■DMA, ▲ Fe(III)-DMA, ●Fe; Detektion mit Massenspektrometrie (DMA, Fe-(III)-DMA) bzw. AAS (Fe); Identifizierung über MS³ (Fe(III)-DMA: $m/z = 356.0 \rightarrow 312.0 \rightarrow 268.0$; DMA: $m/z=303.1 \rightarrow 285.1 \rightarrow 183.0$)

Fe-DMA-Messung in Pflanzenproben

Für die bisher diskutierten Versuchsreihen wurde aufgereinigtes DMA verwendet (aus Pflanzenproben durch Ionenaustausch erhalten). In Pflanzen liegt das DMA (und ggf. Fe-DMA) in einer Matrix aus sehr vielen, teilweise hoch konzentrierten Verbindungen vor. Nachdem gezeigt wurde, dass die Fokussierung von Fe-DMA

zerstörungsfrei funktioniert, ist es notwendig zu prüfen, ob natürliche Gehalte an Fe-DMA in einer Pflanzenmatrix ebenfalls fokussierbar und detektierbar sind. Es werden verschiedene Ernährungszustände untersucht, die anhand ihrer Fe-DMA-Gehalte verglichen und unterschieden werden sollen. In Abbildung 21 ist der Vergleich zweier Xylemexsudat-Proben aus Weizenpflanzen mit natürlichen DMA-Gehalten abgebildet. Unter Eisenmangel produzieren die Pflanzen mehr DMA als unter Normalbedingungen, um den Fe-Mangel auszugleichen. Diese unterschiedlichen Gehalte sollen durch die Fokussierung messbar werden.

Den verwendeten Proben wurde Eisen (aus Eisennitrat) zugesetzt, um freies DMA in den Fe(III)-Komplex zu überführen und DMA und Fe-DMA vollständig als Fe-DMA zu erfassen. Die Messung erfolgte ebenfalls mit Hilfe von MS³-Experimenten, die die charakteristischen Abspaltungen zur eindeutigen Identifizierung lieferten. Aus Abbildung 21 ist zu ersehen, dass die Pflanze, die unter Eisenmangel aufgezogen wurde, im Vergleich zur normal ernährten Kontrollpflanze einen etwa doppelt so hohen Gehalt an Fe(III)-DMA aufweist.

Mit dieser Untersuchung ließ sich zeigen, dass auch die in Pflanzenproben natürlich vorkommenden Gehalte an Fe(III)-DMA zerstörungsfrei isoliert und detektiert werden können. Die Messung erlaubte eine eindeutige Unterscheidung unterschiedlicher Ernährungszustände anhand der Fe-DMA-Gehalte.

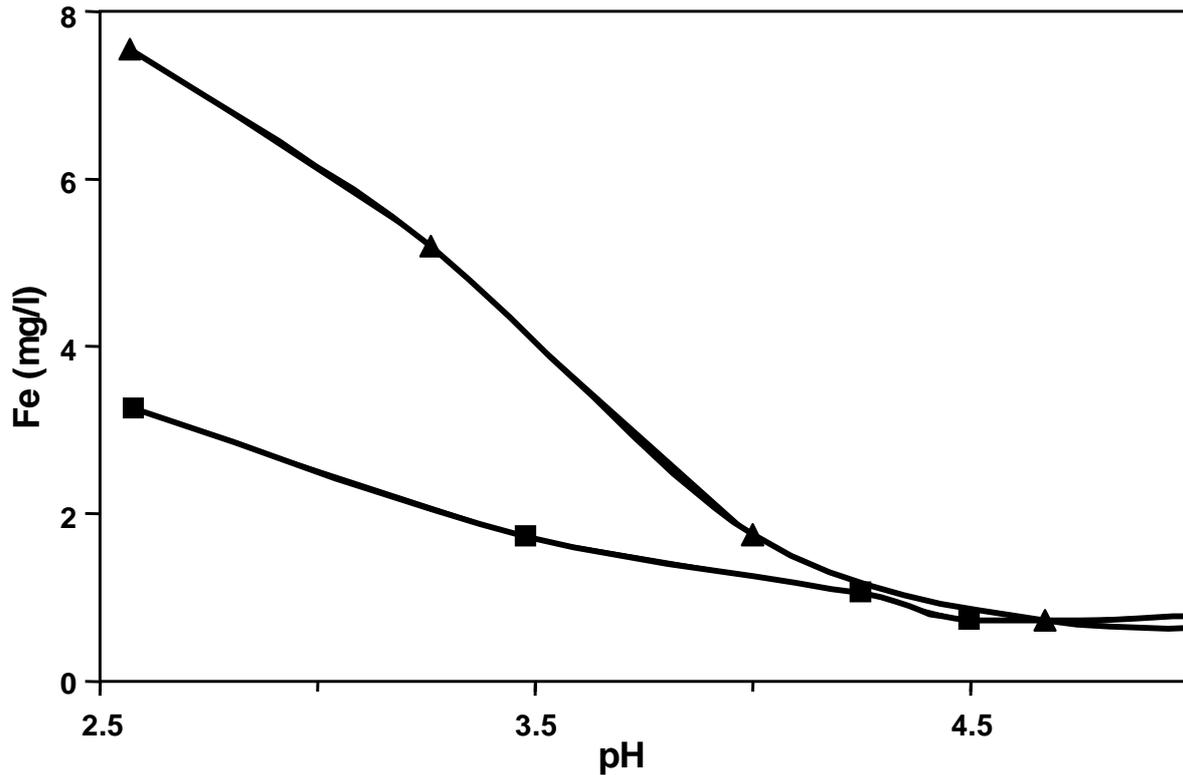


Abbildung 21: Fokussierung von Fe(III)-DMA in zwei Proben Xylemexsudat von Weizenpflanzen ■ Kontrollprobe mit Eisen ernährt ▲ Pflanze unter Eisenmangel aufgezogen; Detektion mit MS³ (Fe(III)-DMA: $m/z = 356.0 \rightarrow 312.0 \rightarrow 268.0$; DMA: $m/z=303.1 \rightarrow 285.1 \rightarrow 183.0$)

6.1.3 Kopplung von IEF mit einer HPLC-Trennung

Die vorherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass Fe(III)-DMA in komplexer Pflanzenmatrix zerstörungsfrei fokussierbar ist und mit der MS³-Detektion eine eindeutige Identifizierung und damit die Unterscheidung unterschiedlicher Ernährungszustände ermöglicht. Um eine allgemeinere Anwendbarkeit zu ermöglichen, kann es jedoch notwendig sein (besonders bei großer Matrixkomplexität), die mit IEF erzeugten Fraktionen in einem zweiten Schritt weiter aufzutrennen. Für die Detektion wäre es sinnvoll, die Analyten möglichst von den CA zu trennen, um Überlagerungen auszuschließen.

Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurden die einzelnen IEF-Fraktionen in der zweiten Dimension mit HILIC-HPLC aufgetrennt. Beispielhaft wird hier die chromatographische Trennung einer IEF-Fraktion (der zweiten Fraktion der DMA-angereicherten Pflanzenprobe) demonstriert (Abbildung 22).

Das abgebildete Chromatogramm (Abbildung 22) lässt erwartungsgemäß sowohl den Fe(III)-DMA-Komplex (C: $m/z = 356,03$) erkennen als auch geringe Mengen des freien DMAs (B: $m/z = 303,1$), das nach dem Fe(III)-Komplex eluiert. Das Verhältnis der Flächen (DMA $\sim 10^3$, Fe(III)-DMA $\sim 10^6$) stimmt mit der Kalkulation überein, die sich aus der Fokussierung (Abbildung 22) ergibt, wonach in der Fraktion hauptsächlich der Fe(III)-Komplex fokussiert, wohingegen der Hauptteil des freien DMAs sich in anderen Fraktionen (höherer pH) finden sollte. Die hier abgebildete zweite Fraktion weist auch in der direkten Messung den Maximalgehalt an Eisenkomplex auf.

Im Totalionenchromatogramm in Spur A ist zu erkennen, dass die Carrier-Ampholyte (a) deutlich vom freien Liganden und vom Fe(III)-Komplex abgetrennt sind. Es kommt also zu keinerlei Überlagerungseffekten durch die Vielzahl an Substanzen im gleichen Massenbereich.

Dieses Beispiel einer zweidimensionalen Trennung demonstriert eine leistungsfähige neue Möglichkeit, Fe(III)-DMA zerstörungsfrei von Matrixbestandteilen abzutrennen und im zweiten Schritt ohne Störung von CAn weiteren Analyseschritten zu unterziehen. Durch die hohe Auftrennung, die durch die Kopplung erreicht wird, ist es möglich, auch ohne MS^n eindeutige Identifizierungen zu erzielen.

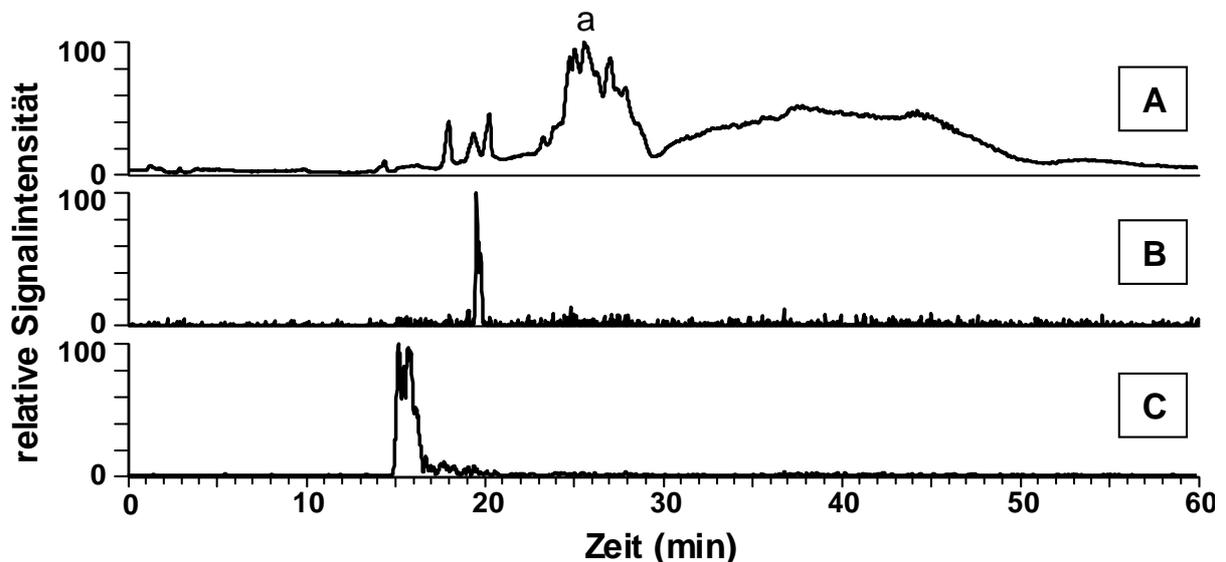


Abbildung 22: Kopplung der IEF-Vortrennung mit einer HILIC-Trennung und MS-Detektion A) TIC; B) DMA ($m/z = 303,1$); C) Fe(III)-DMA ($m/z = 356,03$); a) Carrier-Ampholyte

Die semipräparative IEF bietet eine völlig neue Möglichkeit, intakte Metallkomplexe von Matrixbestandteilen abzutrennen und im gleichen Schritt zerstörungsfrei zu konzentrieren. Das konnte sowohl für synthetische, bioverfügbare Liganden und ihren Metallkomplexe bewiesen werden als auch für DMA und Fe(III)-DMA in originalen Pflanzenmatrices. Es wurden deutliche Unterschiede im Fokussierungsverhalten zwischen Komplexen mit zweiwertigen Metallen, dreiwertigen Metallen und freien Liganden festgestellt. Die Verwendung verschiedener Detektionsverfahren wurde ebenso demonstriert wie die zweidimensionale Trennung unter Kombination mit HILIC-HPLC. Ein großer Vorteil des semipräparativen Maßstabs besteht in der Möglichkeit einer sehr direkten pH-Messung in jeder einzelnen Fraktion. Ein eindeutiger Nachteil des verwendeten Maßstabes liegt darin, dass durch die geringe Auflösung eine Bestimmung von exakten pI-Werten nicht möglich ist. Auch konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei der Fokussierung am Anodenende (Me(III)-EDDHA) um eine richtige Fokussierung handelt. Diesen Ansätzen wird im Folgenden weiter nachgegangen.

6.1.4 Kapillar-IEF von Metallkomplexen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde in einem neuen Ansatz die Fokussierbarkeit von Metallkomplexen mit semipräparativer IEF nachgewiesen. Zwei Aspekte konnten jedoch mit semipräparativer IEF bisher nicht geklärt werden: I) Es ließ sich mit dem verwendeten Aufbau nicht nachweisen, ob die am Anodenende fokussierten Komplexe (Me(III)-EDDHA) einer wirklichen Fokussierung unterliegen oder als negative Moleküle migrieren. II) Wegen der niedrigen Auflösung im verwendeten Maßstab ließen sich die pI-Werte der Komplexe nur abschätzen, aber nicht ausreichend genau bestimmen.

Um diese Aspekte im folgenden Kapitel genauer beleuchten zu können, wurde statt des semipräparativen Maßstabes die Kapillar-IEF (cIEF) für die weiteren Messungen verwendet. Da bei der cIEF keine direkte pH-Messung möglich ist, können die pI-Werte nur mithilfe von Kalibrierung bestimmt werden.

Um die Frage nach der Fokussierung oder Migration des Fe(III)-EDDHA-Komplexes zu beantworten, wurde der Komplex mit cIEF fokussiert (Abbildung 23). Für eine externe Kalibration (Spur A) wurden die metallhaltigen Proteine Cytochrom C (a) und ein Myoglobin-Standard, der zwei Isoformen enthält (b und c) verwendet.

Die Fokussierung von Fe(III)-EDDHA (e) ist in Spur B dargestellt. Es ist deutlich zu

sehen, dass es sich um einen scharf fokussierten Peak handelt, den 1:1-Komplex. Damit ist bewiesen, dass es sich um keine Migration handelt und auch der Fe(III)-Komplex an einem bestimmten pI-Wert fokussiert. Das kleine Signal (d) bei höherem pH-Wert stammt dabei wahrscheinlich aus einer Verunreinigung des o,o-EDDHAs, das für die Herstellung von Standards nur in 86,3 %iger Reinheit zur Verfügung stand. Das o,p-EDDHA wird bei der Herstellung mit gebildet und ist im Gegensatz zum p,p-EDDHA in der Lage, ebenfalls Metallkationen zu komplexieren. Da die Molekülgeometrie jedoch eine andere ist und damit auch die Komplexbildung nicht sechsbindig, sondern nur fünfbindig erfolgt [112], erscheint es durchaus nachvollziehbar, dass sich das Fokussierungsverhalten leicht unterscheidet.

Die verwendeten Standards besitzen die pI-Werte 9,1 (a), 7,2 (b) und 6,8 (c) und zeigen eine sehr gute Linearität zwischen der Mobilisierungszeit und den pI-Werten (der Korrelationskoeffizient betrug >0,99). Da aber das Fe(III)-EDDHA außerhalb des linearen, durch die CA gepufferten Bereichs fokussiert, ist es auch mit dieser externen Kalibration nicht möglich, eine gesicherte Aussage über einen pI-Wert zu machen.

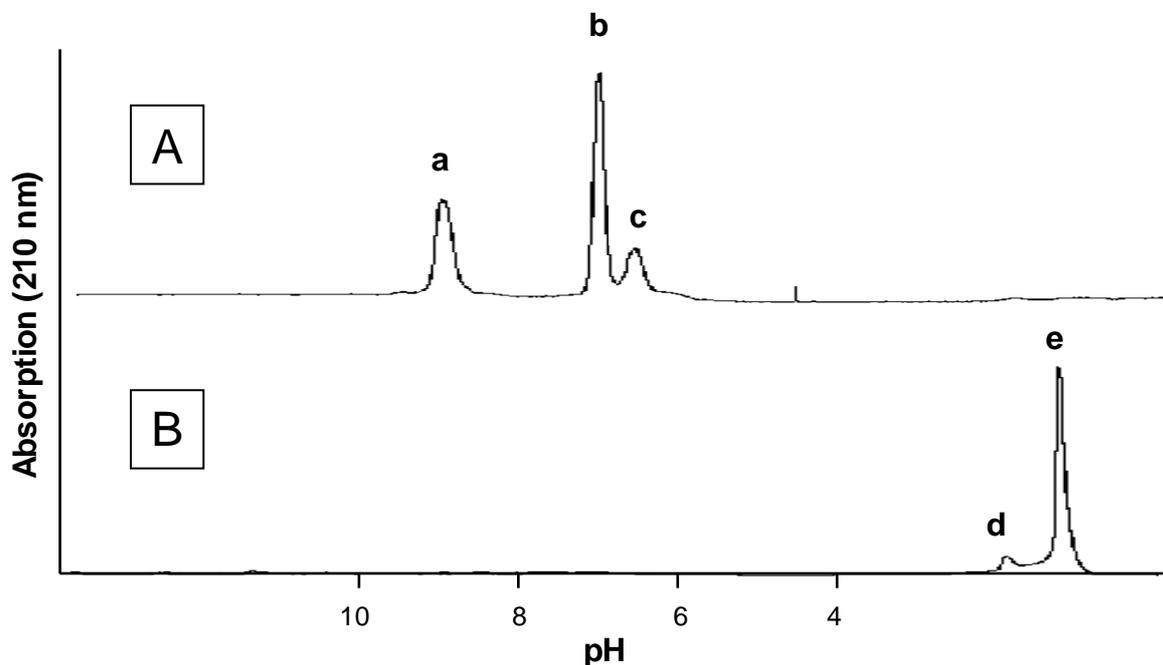


Abbildung 23: cIEF von A) eisenhaltigen Proteinen als bekannte pI-Standards und B) Fe(III)-EDDHA; a) Cytochrom (pI 9,1), b) Myoglobin Isoform I (pI 7,2), c) Myoglobin Isoform II (pI 6,8), d) Signal stammt wahrscheinlich aus einer Verunreinigung des EDDHA, e) Fe(III)-EDDHA

Um den genauen pI von Fe(III)-EDDHA und Ga(III)-EDDHA zu bestimmen, wurde der pH-Bereich variiert, um den pI -Bereich von Fe(III)-EDDHA zu erfassen. Die verwendete Carrier-Ampholytmischung pufferte den pH-Bereich von 2,5-5,0 und erzeugte in diesem Bereich einen linearen pH-Gradienten. Die Linearität des pH-Gradienten wurde mithilfe von 3 internen pI -Standards bestimmt, Amyloglycosidase (pI 3,6), Trypsin-Inhibitor (pI 4,6) und β -Lactoglobulin (pI 5,1), und war mit einem Korrelationskoeffizienten von $>0,99$ sehr gut.

Mithilfe dieser Standards konnte der pI -Wert von Fe(III)-EDDHA (A, Signal f) auf 2,6 bestimmt werden. Die Identität des Komplexes konnte dank der eindeutigen Farbe des Fe(III)-EDDHA-Komplexes bei einer Wellenlänge von 480 nm sichergestellt werden. Abbildung 24 zeigt bei 280 nm jedoch neben den Signalen der Standards und der gesuchten Komplexe mehrere andere Signale.

Die Standards sind in den Signalen a und d zu finden. Signal e entstammt als Blindwertsignal den verwendeten CAen. Auffällig ist, dass das Signal f für das Gallium viel kleiner ist als das im Eisen-Lauf. Die Signale c und d sind dagegen deutlich größer als beim Eisen. Davon ausgehend, dass der pI des Ga(III)-EDDHAs gleich ist wie der pI des Fe(III), was durch die semipräparative IEF gestützt wird, sind für dieses Ergebnis zwei Erklärungen möglich. Die erste mögliche Erklärung ist die Dissoziation des intakten Komplexes. Dadurch würde das Signal des Komplexes deutlich kleiner und das des freien Liganden größer. Das würde bedeuten, dass es sich bei Signal c mit pI 4,1 um den freien Liganden handelt. Da dieses Signal auch in der Fokussierung des Eisenkomplexes zu finden ist, müsste auch dieser Komplex einer Dissoziation unterliegen. Allerdings sprechen die thermodynamische Stabilität und die vorhergegangene Fokussierung im analytischen Maßstab mit externen Standards, bei der der Komplex vollkommen stabil war, gegen diese Theorie.

Die zweite denkbare Theorie geht von Wechselwirkungen der Metallkomplexe mit den Proteinstandards aus. Dabei sind sowohl Proteinaddukte mit den Komplexen denkbar als auch ein Metallaustausch. Eine Identifizierung der Proteinaddukte ist mit dem UV-Detektor am CE-Gerät aufgrund fehlender Strukturinformationen nicht möglich. Da jedoch bekannt ist, dass viele Proteine, und darunter auch die verwendeten Standards, mehr oder weniger stark mit Metallspezies oder Metallen interagieren [132-134], erscheint diese zweite Theorie als die wahrscheinlichere.

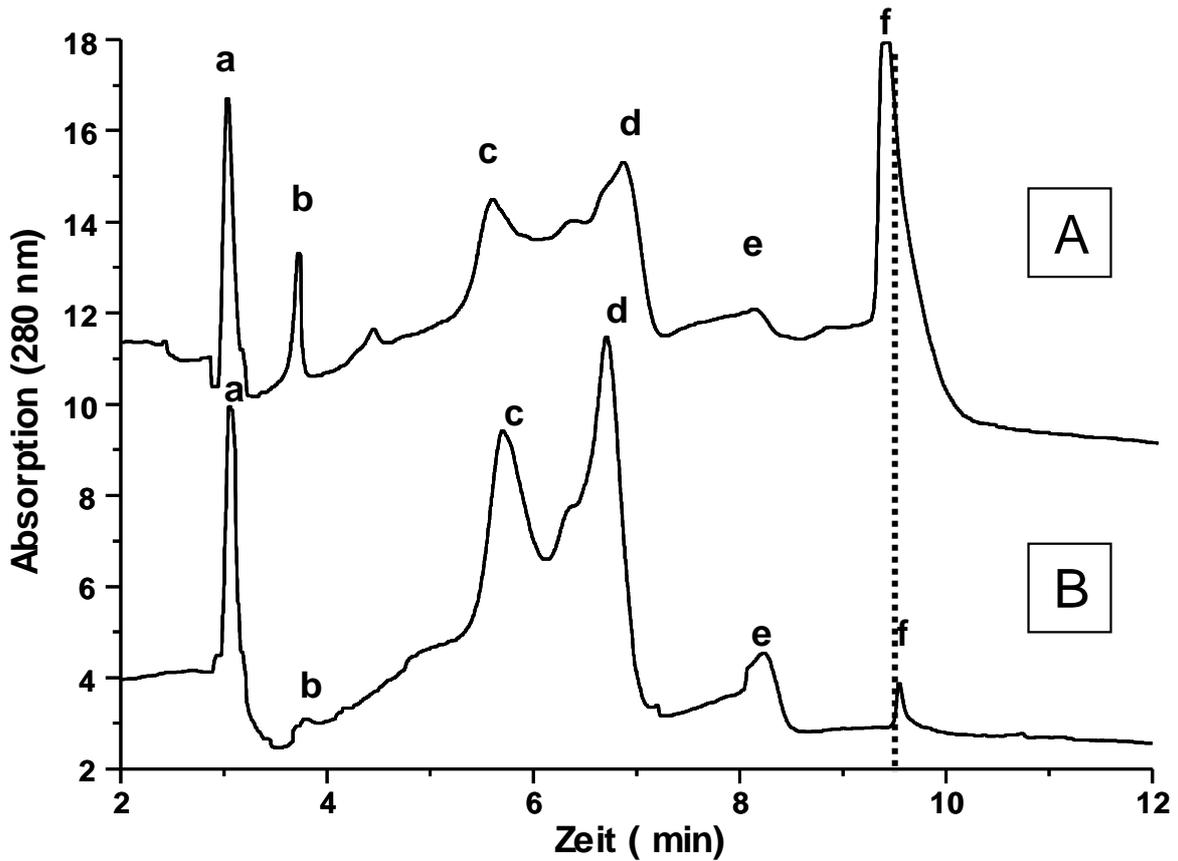


Abbildung 24: cIEF von A) Fe(III)-EDDHA; B) Ga-EDDHA in 1 % Pharma Lyte 2,5-5,0 mit 0,2 % HEC und 0,5 % TEMED; Fokussierung 10 min bei 15 kV; hydrodynamische Mobilisierung mit 40 mbar und 15 kV; UV-Detektion bei 280 nm; zwei pI-Standards a) β -Lactoglobulin pI 5,1, d) Amyloglycosidase pI 3,6; f) Fe-EDDHA/Ga-EDDHA (pI 2,6; e) Blindwert der CA; b)+c) Signale wahrscheinlich durch Interaktion der Komplexe mit den Proteinstandards

Für die Komplexe von Gallium und Eisen mit EDDHA konnten trotz der Proteininteraktionen die pI-Werte genau bestimmt werden. Wie aus den semipräparativen Ansätzen schon zu ersehen ist, besitzen beide Komplexe den gleichen pI, der mit cIEF auf 2,6 bestimmt wurde. Für die pI-Bestimmung der Me(II)-Komplexe sind die auftretenden Komplexe jedoch ein größerer Störfaktor. Die Signale sind im ähnlichen pH-Bereich wie auch die Komplexsignale, und im Gegensatz zum Eisenkomplex gibt es keine spezielle Wellenlänge für eine eindeutige Identifizierung. Daher können die pIs der Komplexe mit zweiwertigen Metallen und des freien Liganden auf diese Art und Weise nicht bestimmt werden.

6.1.5 CE von Metallspezies

Für die Me(III)-EDDHA-Komplexe konnten die Ergebnisse der semipräparativen IEF mit Hilfe der cIEF bestätigt und ergänzt werden. Für die Me(II)-EDDHA-Komplexe bleibt noch zu klären, ob es sich bei der Fokussierung um einen oder zwei unterschiedliche Komplexe handelt. Zu diesem Zweck wurden CE-Experimente durchgeführt. Die CE ist hier eine sinnvolle Ergänzung zur IEF, da die Komplexe nach demselben Prinzip, entsprechend ihrer unterschiedlichen Ladung, aufgetrennt werden.

Abbildung 25 zeigt die CE-Ergebnisse der Al(III)-, Ga(III)-, Fe(III)- Komplexe im Vergleich zu Zn(II)-, Ni(II)-EDDHA und dem freien Liganden. Die Komplexe von EDDHA mit dreiwertigen Metallen sind stabil und migrieren in einem scharfen Peak. Dabei zeigen die Ga(III)- und Fe(III)-Komplexe ein sehr ähnliches Migrationsverhalten, was gut zu den Ergebnissen der Fokussierung passt, in denen für beide der gleiche pI gemessen wurde. Der Al(III)-Komplex zeigt eine im Vergleich zu Gallium und Eisen etwas höhere Migrationszeit, was zu den Ergebnissen der semipräparativen IEF passt.

EDDHA als freier Ligand zeigt bei kürzerer Migrationszeit einen breiten Peak, vergleichbar zum breiten Signal bei der IEF. Bei der Migration der Komplexe mit den zweiwertigen Metallen sind für beide Metalle je zwei Signale zu finden. Besonders deutlich ist das für Zn(II)-EDDHA zu sehen. Auch dieses Ergebnis passt gut zur semipräparativen IEF, in der trotz der geringen Auflösung der Trennung schon die Existenz einer zweiten Spezies andeutungsweise festzustellen war. Die Aufteilung in zwei Signale könnte daraus resultieren, dass EDDHA mit zweiwertigen Metallen Komplexe mit unterschiedlichen Stöchiometrien bildet. Mit der hier verwendeten Detektion lässt sich die genaue Identität jedoch nicht nachweisen.

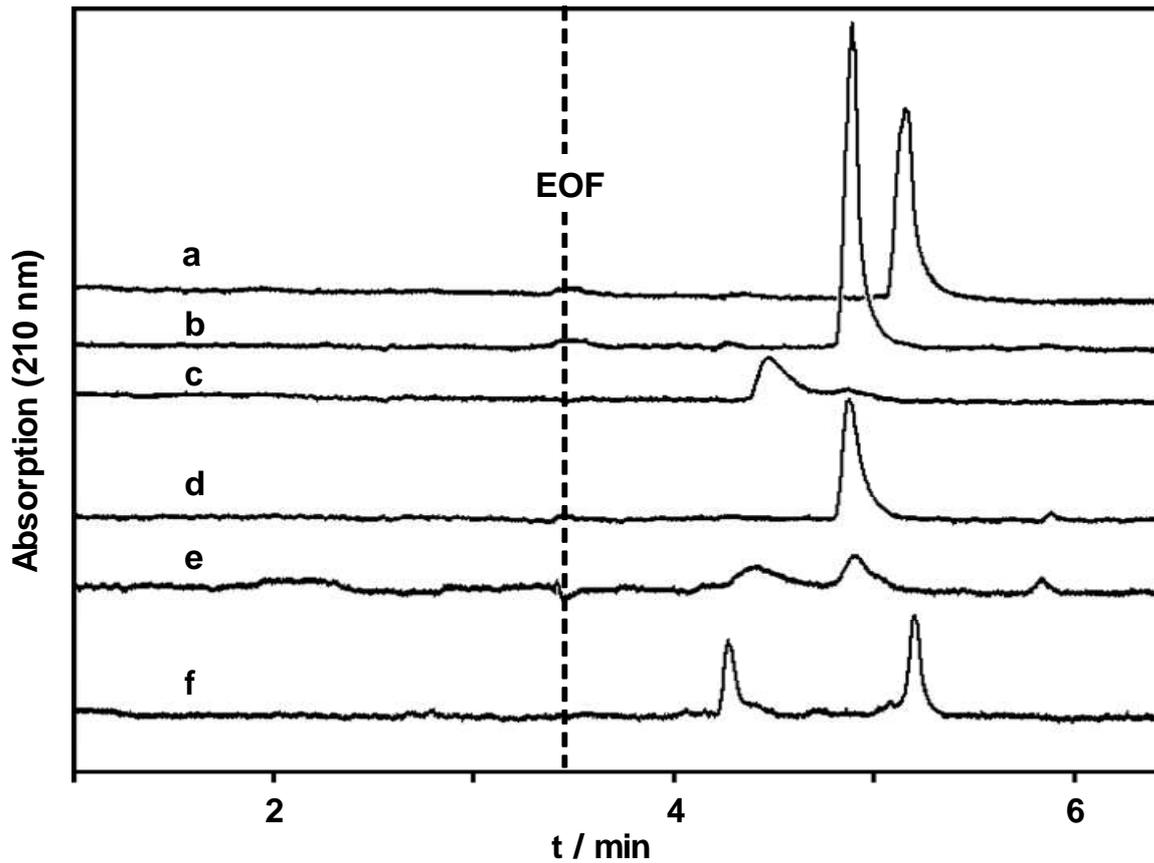


Abbildung 25: CE von Metall-EDDHA-Komplexen in MES/Tris (je 0,2 mmol/l) pH 7,1; Detektion mit UV bei 210 nm; a) Al(III)-EDDHA, b) Fe(III)-EDDHA, c) freies EDDHA, d) Ga(III)-EDDHA, e) Ni(II)-EDDHA, f) Zn(II)-EDDHA

Die IEF als Vortrennmethode für nicht kovalente Metallkomplexe stellt einen völlig neuen Ansatz dar. IEF ist eine sanfte Technik zur Anreicherung von labilen Metallspezies und gleichzeitigen Abtrennung von Matrixbestandteilen. Es konnte gezeigt werden, dass Metallkomplexe einen pI -Wert besitzen und stabil fokussierbar sind. Auch die Trennbarkeit von Komplexen mit unterschiedlichen Metallen ist möglich. Die Anwendbarkeit der mit dem synthetischen Liganden EDDHA und seinen Komplexen entwickelten Methode wurde für pflanzliche Metallkomplexe (am Beispiel von Fe(III)-DMA) bewiesen. Es wurden reale Gehalte in originalen Matrices nachgewiesen und so verschiedene Ernährungszustände voneinander unterschieden. Für weiterführende Trennungen wurde die IEF mit einer HPLC-Trennung kombiniert.

Mit Hilfe der cIEF wurden pI -Werte für Me(III)-EDDHA-Komplexe bestimmt und die Ergebnisse der semipräparativen IEF bestätigt. Das Fokussierungsverhalten der Me(II)-EDDHA-Komplexe wurde durch CE-Messungen ergänzt und bestätigt.

6.2 Trennung und Identifizierung von labilen Metallspezies

Für die Beantwortung pflanzenbiologischer Fragestellungen im Hinblick auf Metalltransportprozesse ist es zwingend erforderlich, Informationen über die vorliegenden Metallspezies zu erlangen. Die Entwicklung eines verlässlichen Trennverfahrens zur Auftrennung intakter Komplexe ist daher eine zentrale Problemstellung dieser Arbeit (s. Kapitel 2). Besonders für kleine, nicht-kovalente Metallkomplexe bestehen in der Speziesanalytik Schwierigkeiten aufgrund von unbekanntem und geringen Stabilitäten und der Verschiebung von bestehenden Gleichgewichten. Die besonderen Voraussetzungen für die Messung von labilen Spezies werden deshalb in Kapitel 6.2.1 detailliert ausgeführt.

Da es sich bei den nicht-kovalenten Metallkomplexen um sehr polare Verbindungen handelt, ist HILIC das geeignete Trennprinzip (s. Kapitel 4.2). Die ESI-MS-Detektion in Verbindung mit der LC-Trennung stellt die beste Methode zur eindeutigen Detektion und Identifizierung von Metaboliten und auch Metallkomplexen dar. Der besondere Anspruch sowohl an die Trennung als auch an die Detektion liegt darin, die polaren, labilen Komplexe ohne unkontrollierte Veränderungen oder sonstige Artefakte analysieren zu können.

Bevor das Trennverhalten der labilen Metallspezies untersucht werden konnte, mussten folgende Voraussetzungen geschaffen werden:

- I) Verschiedene Trennsäulen mussten anhand ihrer Trenneigenschaften unter den gegebenen Trennbedingungen charakterisiert werden (anhand von Metabolitstandards mit bekannten Eigenschaften und Stabilitäten) (Kapitel 6.2.2)
- II) Auf Basis der ermittelten Trenneigenschaften mussten passende Säulenmaterialien ausgewählt werden
- III) Das Verhalten von Metallkomplexen auf den ausgewählten Säulenmaterialien unter den gewählten Trennbedingungen wurde am Beispiel eines definierten, stabilen Metallkomplexes getestet (Kapitel 6.2.2).
- IV) Die Zusammensetzung von Modellmischungen der untersuchten Metall-Liganden-Systeme unter den verwendeten Messbedingungen musste bestimmt werden (Kapitel 6.2.3)

Auf Basis der Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen konnte dann das Trennverhalten der Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Spezies untersucht werden (Kapitel 6.2.4). Des Weiteren wurde die Anwendbarkeit der Trennung auch in Pflanzenmatrix gezeigt. Untersuchungen mit CE als komplementärer Technik lieferten ergänzende Ergebnisse zur HPLC-Trennung.

6.2.1 Voraussetzungen zur Analyse von Metallspezies

Vor der Analyse von Metallspezies muss sichergestellt sein, dass es nicht zur Messung von Artefakten kommt. Diese können folgendermaßen entstehen:

- I) Dissoziation der Komplexe und Metalladsorption auf dem Säulenmaterial (besonders freie Silanolgruppen führen oft zu Metalladsorption [135])
- II) Memoryeffekte durch Remobilisierung adsorbierter Metalle von der Säule
- III) Änderung der Stöchiometrie durch Austausch von Metallen oder Liganden

Insbesondere für Systeme wie Eisen-Citrat ist bekannt, dass es ein kompliziertes Gleichgewicht vieler Spezies gibt, das maßgeblich von der chemischen Umgebung, vom pH-Wert und vom Metall-Liganden-Verhältnis beeinflusst wird [26-27, 136].

Um diesen speziellen Problemen bei der Analytik zu begegnen, wurden neben den üblichen experimentellen Vorkehrungen zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Blindwerte, Mehrfachmessungen) (s. Kapitel 4.3.2) folgende Vorkehrungen getroffen:

Kontrolle auf Metall-(Eisen-)Blindwerte:

Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, dass es selbst bei thermodynamisch stabilen Eisen-Komplexen, etwa Phytosiderophor-Komplexen, zu partieller Dissoziation und dadurch zu Adsorption von Eisen auf der Säule kommen kann [37]. Eisen-Citrate sind thermodynamisch weniger stabil als Phytosiderophor-Komplexe, umso größer ist damit auch die Gefahr der (reversiblen oder irreversiblen) Eisen-Adsorption auf dem Säulenmaterial. Daher ist es bei den Untersuchungen der labilen Metallkomplexe (besonders Eisen-Citrate) besonders wichtig, Beeinflussungen durch Eisen auf dem Säulenmaterial (s.o.) auszuschließen. Citrat ist der zentrale Ligand der systematischen Untersuchungen zum Trennverhalten der Komplexe (Kapitel 6.2.3) und in Pflanzenproben in großen Mengen vorhanden.

Damit besteht die Gefahr, dass das Citrat adsorbiertes Eisen remobilisiert und so Eisen-Citrate vorgetauscht werden.

Ein erprobtes Verfahren, um die Gefahr einer solchen Remobilisierung festzustellen besteht darin, den entsprechenden freien Liganden zu injizieren und zu kontrollieren, ob nur der freie Ligand oder auch der Eisenkomplex eluiert wird [25, 37]. In diesem Fall wurde Citrat in hoher Konzentration injiziert und auf Eisen-Citrate kontrolliert. Bei positiven Tests auf Metallblindwerte wurde EDTA injiziert, um die Metalle vollständig von der Säule zu entfernen. EDTA bildet einen thermodynamisch stabilen Komplex mit Eisen ($\log k(\text{Fe(III)-EDTA}) = 25,7$ [137]) und ist so in der Lage, auch fest adsorbiertes Eisen von der Säule zu eluieren und diese so zu reinigen

6.2.2 Evaluierung geeigneter Säulenmaterialien

Für die hier untersuchten Metallkomplexe eignet sich HILIC besonders, da diese zum einen sehr polar sind und da hier zum anderen der Verteilungsmechanismus sehr schonend ist und nur schwache Wechselwirkungen auf die labilen Komplexe auftreten [72, 138] (s. Kapitel 4.2). Für HILIC-Trennungen steht eine Vielzahl verschiedener Säulenmaterialien mit sehr unterschiedlichen Funktionalitäten zur Verfügung, die unterschiedliche Trenneigenschaften und somit verschiedene Selektivitäten besitzen [72, 139-141]. Die Elution wird in der HILIC-Chromatographie von verschiedenen Mechanismen beeinflusst. Die Retention bei den Trennungen beruht hauptsächlich auf Verteilung der Analyten zwischen dem organischen Laufmittel und einer immobilisierten Wasserschicht an der stationären Phase [71, 141-143]. Damit wird die Elutionsreihenfolge durch die Ladung bzw. Polarität der Analyten bestimmt [140-141]. Daneben tragen auch die Wechselwirkungen mit der Festphase zur Retention der Analyten bei [72, 141]. Hemström und Irgum [72] fassten Untersuchungen zusammen, die aus dem Verhältnis von $\ln(k)$ und dem Volumenanteil des stärkeren Eluenten (Φ) (bei HILIC Wasser) Aussagen zum vorherrschenden Trennmechanismus ableiteten. Dabei wurde eine lineare Abhängigkeit von $\ln(k)$ und Φ auf einen vorherrschenden Verteilungsmechanismus zurückgeführt, während eine Linearität des $\ln(k) - \ln(\Phi)$ -Verhältnisses ein Hinweis auf überwiegende Adsorption war [72, 141, 144-145]. In den Untersuchungen wurde abhängig von Analyt, pH-Wert und Säulenmaterial Verteilung, Adsorption oder eine Mischung aus beidem als vorherrschender Trennmechanismus identifiziert [144]. Guo et al. verglichen Retentionsenthalpien von polaren Analyten auf

unterschiedlichen HILIC-Phasen miteinander [142]. Dabei zeigte sich, dass die unterschiedlichen Analyten auf den Säulen ähnlich große negative Enthalpien aufwiesen, was sie als Nachweis für einen einheitlichen Mechanismus (Verteilung) interpretierten. Ausnahmen waren dabei Säuren, die auf Aminofunktionalitäten positive Enthalpien als Folge von Ionenaustauscheffekten induzierten [142], so dass auch in dieser Untersuchung die Retention auf eine Mischung verschiedener Mechanismen zurückgeführt wurde.

Für Silica-Oberflächen ist bekannt, dass die Silanolgruppen durch das adsorbierte Wasser deaktiviert und damit die Effekte auf die Analyten abgeschwächt werden [72]. Damit ist die Gefahr der Speziestransformation, bzw. Dissoziation geringer als bei starken Wechselwirkungen wie z. B. bei Ionenaustauschern.

Es wurden zunächst zehn Säulen ausgewählt (s. Tabelle 6), deren Eignung zur Trennung polarer Metabolite unter den gewählten Trennbedingungen bewertet wurde. Die gewählten Säulen decken ein breites Spektrum ab, von relativ unpolaren stationären Phasen über polare bis hin zu geladenen Phasen. Die Säulen lassen sich in vier unterschiedliche Gruppen einteilen:

- Underivatisiertes Kieselgel (Silicaphase)
- Ungeladene Funktionalitäten (Carbamoyl-, quervernetzte Diol-, PFP-Phasen)
- Positiv geladene Liganden (Aminophasen)
- Negativ geladene Liganden (Silica Hybrid)
- Zwitterionische Phasen (Sulfobetainphasen)

Underivatisierte Silicaphasen zeigen neben dem Verteilungsmechanismus eine Retention der Analyten durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und Ionenaustauscheffekten an dissoziierten Silanolgruppen. Sie sind die ursprüngliche HILIC-Phase, die später durch Silica-Material mit kovalent gebundenen funktionellen Gruppen ergänzt wurde. Die Ausbildung einer immobilisierten Wasserschicht deaktiviert die Silanolgruppen und reduziert dadurch die starken ionischen Wechselwirkungen [72, 146]. Guo et al. verglichen das Trennverhalten von Acetylsalicylsäurederivaten auf einer Silica-Säule mit dem auf einer Amid-, Amin- und einer zwitterionischen Säule [142], wobei die Retention auf der Silicaphase zwar geringer war als auf den anderen Materialien, was auf elektrostatische Abstoßung der Säuren zurückzuführen war, die Trennung wegen des hohen Acetonitrilgehaltes

aber dennoch gegeben war. Auch bei der Trennung von wasserlöslichen Vitaminen wurde beschrieben, dass bei sinkendem Acetonitril-Gehalt die Retention der sauren Analyten auf der Silicaphase stark absinkt [147-148]. Die elektrostatische Abstoßung der Säuren trotz des deaktivierenden Effektes der immobilisierten Wasserschicht auf die Silanolgruppen wurde dabei durch die geringere Dicke dieser Schicht im Vergleich zur Amino- und Diolphase erklärt. Underivatisierte Silanolgruppen sind dafür bekannt, Metalle (besonders Eisen) zu adsorbieren, was sich ggf. negativ auf die Trennung auswirkt und für die Untersuchung von Eisen-Spezies unakzeptabel ist [135].

Diolphasen und Amidphasen sind unterschiedlich stark polar, aber unter den hier verwendeten Bedingungen nicht ionisierbar. Es können Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, die über den Verteilungsmechanismus hinaus zur Retention der Analyten beitragen [72, 146]. Die stark polare Amidphase bildet durch den negativen induktiven Effekt des Carbamoyl-Sauerstoffatoms wesentlich stärkere Wasserstoffbrücken aus als die Diolphase. Besonders die in dieser Arbeit ebenfalls verwendete Amid-80-Säule wurde für zahlreiche verschiedenste Metabolomic-Studien angewendet [149]. Auch Trennungen für Nucleotide wurden bereits publiziert [141, 148]. Die untersuchten Testsubstanzen sind neutral und wurden bei verschiedenen pH-Werten mit einer Ausnahme gut getrennt. Die Retention ist auf der Amid-80-Säule stärker als auf der zwitterionischen Phase unter den gleichen Bedingungen, da die Nucleotide viele H-Akzeptoren (N- und O-Atome) besitzen, die die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit der Amidphase begünstigen.

Die Eignung von quervernetzten Diolphasen wurde besonders für die Trennung von Säuren publiziert [150], da die Quervernetzung restliche freie Silanolgruppen abschirmt und so die elektrostatische Abstoßung der Analyten verhindert.

PFP-Phasen sind unpolare stationäre Phasen, deren Retentionsverhalten neben Verteilung auf π - π -Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Damit sind sie besonders für die Trennung aromatischer Analyten geeignet [151].

Die (je nach pH-Wert) positiv geladenen Aminophasen bilden starke elektrostatische Wechselwirkungen bzw. eine Anionenaustauscherwirkung aus [147, 152]. Damit kommen sie in der pharmazeutischen Analyse zum Einsatz, beispielsweise zur Trennung von Tetracyclinen [153]. Hierbei dominiert die Adsorption der zwitterionischen Analyten an die unter den vorliegenden Bedingungen geladene

Aminogruppe.

Auch die Nanopolymer-Silica-Hybrid-Phase besitzt Ionenaustauscherfähigkeiten. Bei diesem Material handelt es sich um Nano-Polymer/Silica-Hybrid-Partikel, die neben RP-Funktionalitäten innerhalb der Poren Anionenaustauscher-Funktionalitäten besitzen; an der Außenseite der Partikel befinden sich sulfonierte Nanopolymer-Kugeln mit Kationenaustauscher-Funktionalitäten. Damit besteht eine räumliche Trennung der Funktionalitäten, so dass sich die Ladungen der Funktionalitäten nicht ausgleichen können wie sich bei einigen zwitterionischen Materialien [154] und gleichzeitig Anionen und Kationen trennen lassen [155]. Diese Besonderheit kommt beispielsweise bei der Analyse von pharmazeutischen Wirkstoffen wie Penicillin G zusammen mit K^+ als Gegenion zum Tragen [155]. Dabei wird das Penicillin bei geringerem Acetonitrilgehalt ($< 80\%$) durch einen kombinierten RP-Verteilungs-Mechanismus und bei hohem Acetonitrilgehalt ($> 80\%$) durch einen kombinierten AEX-Verteilungs-Mechanismus retardiert. Das K^+ wird gleichzeitig durch eine SCX-Verteilungs-Kombination retardiert. Durch die unterschiedlichen Mechanismen lässt sich die Trennung über die Auswahl der Trennbedingungen (ACN-Gehalt, pH) sehr individuell verändern und spezifischen Trennproblemen anpassen [155].

Die Sulfobetainphasen tragen Sulfonsäuregruppen und quarternäre Amine im Verhältnis 1:1. Der Abstand zwischen den funktionellen Gruppen beträgt drei Methylengruppen. Die Nettoladung des Materials ist null; wegen der Ausrichtung (Sulfonsäuregruppen an der Oberfläche) besitzen sie unabhängig vom pH-Wert eine geringe negative Oberflächenladung ohne starke Ionenaustauscherwirkung [72, 156]. Die Sulfobetainphasen wurden bereits vielfach für HILIC-Trennungen von polaren Analyten, wie z. B. underivatisierten Aminosäuren, verwendet [157] und gehören im Bereich der Metabolomanalyse zu den am häufigsten verwendeten Säulen [149]. Sie werden häufig für vergleichbare Problemstellungen eingesetzt wie Amidsäulen [141]. Sulfobetainphasen kamen bereits für die Trennung stabiler Metallkomplexe wie Arsenspezies [145] und Phytosiderophorkomplexe [37] zum Einsatz. Für die Trennung von Arsenspezies wurde das Trennverhalten systematisch untersucht und es wurde ermittelt, dass für aliphatische wie auch für phenolische Spezies sowohl Verteilung als auch Adsorption eine signifikante Rolle bei der Retention spielen [145].

Tabelle 6: Verwendete HILIC-Materialien, funktionelle Gruppen und Angabe der möglichen Interaktionen mit den Analyten (Spezifikationen laut Herstellerangaben)

Säule	Funktionelle Gruppen	Interaktionen
TSKgel Amide-80 (Tosoh)	Carbamoyl	Wasserstoffbrückenbindungen
Luna-HILIC (Phenomenex)	Crosslinked Diol	Wasserstoffbrückenbindungen
Zic-HILIC (Sequant)	Sulfobetain	Schwache elektrostatische WW
Nucleodur HILIC (Macherey-Nagel)	Sulfobetain	Schwache elektrostatische WW
Kinetex HILIC (Phenomenex)	Silica	Kationenaustausch
Luna NH2 (Phenomenex)	Alkylamino	Anionenaustausch
TSKgel-NH2-100 (Tosoh)	Alkylamino	Anionenaustausch
Acclaim Trinity P1 (Dionex)	Nanopolymer Silica Hybrid	Kationenaustausch (Oberfläche, stark); Anionenaustausch (Poren, schwach)
Kinetex PFP (Phenomenex)	Pentafluororphenyl	Dipol-Dipol-WW; Wasserstoffbrückenbindungen; π - π -WW
Hypersil Gold PFP (Thermo Scientific)	Pentafluororphenyl	Dipol-Dipol-WW; Wasserstoffbrückenbindungen; π - π -WW

Die verwendeten Säulenmaterialien decken eine breite Auswahl möglicher Wechselwirkungen ab, die bei der Trennung polarer Metallkomplexe denkbar sind. Damit sollten neben positiv und negativ geladenen Analyten auch zwitterionische und Komplexe mit aromatischen Resten trennbar sein.

Bei der Charakterisierung der Trennphasen muss zunächst auf die Verwendung von Metallkomplexen verzichtet werden. In vielen Metall-Liganden-Systemen besteht anstelle eines einzigen definierten Komplexes ein komplexes und variables Speziesgleichgewicht, dessen Lage bereits durch geringe Veränderungen der Bedingungen verschoben wird. Für Eisen-Citrat-Mischungen existieren bereits

Studien, die die komplexe Zusammensetzung zeigen und die mangelnde Eignung als Standards verdeutlichen [26-27]. Darüber hinaus ist die Stabilität von Metallkomplexen, besonders bei Trennungen, nicht bekannt. Ausnahmen bilden dabei EDDHA und EDTA, die trennungsstabile 1:1-Komplexe bilden [113-114, 116, 130-131], die jedoch für eine umfassende Charakterisierung nicht ausreichend sind. Für die Charakterisierung der Trenneigenschaften wurden stabile pflanzliche Metaboliten herangezogen, deren Stabilitäten und chemische Eigenschaften (wie z.B. pK-Werte von funktionellen Gruppen, pI-Werte) bekannt sind (Tabelle 7) und die damit die Grundvoraussetzung für Standardsubstanzen erfüllen. Die Auswahl der Standardsubstanzen umfasst folgende Gruppen, die die verschiedenen Aspekte der Wechselwirkungen mit den stationären Phasen abdecken:

- Neutrale Aminosäuren (Alanin und Phenylalanin)
- Negativ geladene Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure)
- Positiv geladene Aminosäuren (Histidin und Arginin)
- Mehrfach negativ geladene organische Säuren (Citronensäure)
- Zwitterionisches Tripeptid (reduziertes Glutathion (GSH))

Tabelle 7: Standardsubstanzen zum Test von unterschiedlichen HILIC-Materialien mit ihren Ladungseigenschaften

Verbindung	Verbindungs-klasse	pK _s	Ladungszustand bei pH 5,5
Phenylalanin (Phe)	unpolare, aromatische, neutrale AS	2,58 9,24	Ungeladen
Alanin (Ala)	unpolare, aliphatische, neutrale AS	2,3 9,9	Ungeladen
Histidin (His)	polare, aromatische, basische AS	1,78 6,04 8,97	Einfach positiv geladen
Arginin (Arg)	polare, aliphatische, basische AS	2,81 9,09 13,2	Einfach positiv geladen
Glutaminsäure (Glu)	polare, aliphatische, saure AS	2,19 4,25 9,67	Einfach negativ geladen
Asparaginsäure (Asp)	polare, aliphatische, saure AS	1,88 3,65 9,60	Einfach negativ geladen
Citrat (Cit)	organische Säure	3,13 4,76 6,40	Zweifach negativ geladen
Glutathion reduziert (GSH)	Tripeptid	2,17 2,21 9,13	Einfach negativ geladen

Die oben aufgeführten Standards wurden auf allen ausgewählten Säulen unter den gleichen Trennbedingungen getestet. Dabei wurde der pH-Wert an die Gegebenheiten im Xylem angepasst und auf 5,5 eingestellt. Es wurde überprüft, ob und wie stark die Standards auf den Säulen retardiert wurden und wie gut die Trennung voneinander ist.

Auf den zwei hydrophoben Pentafluorophenylphasen (PFP) (Kinetex PFP, Hypersil Gold PFP) war keine Retention der beim vorliegenden pH-Wert geladenen Analyten festzustellen, nur die ungeladenen Phenylalanin und Alanin wurden retardiert. Da die PFP-Säulen nur hydrophobe Wechselwirkungen, wie π - π -Wechselwirkungen und

Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ausbilden, können keine geladenen Substanzen retardiert werden. Somit sind sie für die hier zu bearbeitenden Aufgaben ungeeignet. Auf den Aminophasen (Luna-NH₂ und TSKgel-NH₂-100) war die Retention unter den gegebenen Trennbedingungen so stark, dass die Analyten nicht vollständig eluiert wurden. Die positiv geladenen Aminogruppen besitzen trotz des teilweise abschirmenden Effektes der immobilisierten Wasserschicht Ionenaustauschereigenschaften, die negativ geladene Analyten stark retardieren [142, 146-147, 155]. Da es sich bei den nicht-kovalenten Metallkomplexen i. d. R. auch um negativ geladene Substanzen handelt (vgl. Metall-PS-Komplexe [37]), sind Aminophasen für die zu bearbeitenden Aufgaben nicht geeignet.

Prinzipiell besteht die Möglichkeit, die Retentionszeit durch geänderte Elutionsbedingungen zu verkürzen. Die Erhöhung der Temperatur während der Trennung beispielsweise verkürzt die Elutionszeit entsprechend der van't-Hoff-Gleichung.

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \ln \phi$$

Formel 7: k' = Kapazitätsfaktor, ΔH° = Retentionsenthalpie, ΔS° = Retentionsentropie, R = Gaskonstante, Φ = Phasenverhältnis

Dieser Zusammenhang gilt für die RPLC; für HILIC gilt die Gleichung unter der Voraussetzung, dass der Verteilungsmechanismus überwiegt [142]. Guo et al. wiesen jedoch nach, dass Säuren sich auf Aminophasen gegensätzlich verhalten, was auf die Retention durch Ionenaustausch zurückgeführt wurde [142]. Eine zweite Möglichkeit der Einflussnahme auf die Retention bietet sich durch die Veränderung der Laufmittelzusammensetzung, wobei der pH-Wert durch die biologischen Gegebenheiten festgelegt ist (s. Kapitel 3.2). In mehreren Arbeiten wurde eine Verringerung der Retentionszeiten durch erhöhte Pufferkonzentrationen im Laufmittel nachgewiesen [138, 147]. Durch die erhöhte Pufferkonzentration wird die Polarität der wässrigen Phase und damit die Elutionsstärke erhöht [138], außerdem werden die positiv geladenen funktionellen Gruppen durch das Salz abgeschirmt [147]. Da Puffer aber potentielle Liganden für Metalle darstellen und somit möglicherweise die Dissoziation von Metallkomplexen mit unbekanntem Stabilitäten fördern, ist es im Hinblick auf das Ziel der Arbeit, Metallkomplexe zu trennen, nicht sinnvoll, die Pufferkonzentration stark zu erhöhen.

Auf der Silica-Hybrid-Phase (Acclaim Trinity P1) wurden die geladenen Analyten

(sowohl positiv als auch negativ) innerhalb der Analysenzeit nicht von der Säule eluiert. Dieses Retentionsverhalten ist darauf zurückzuführen, dass das Säulenmaterial neben RP-Eigenschaften sowohl Kationen- als auch Anionenaustauschereigenschaften besitzt. Bei diesen Funktionalitäten handelt es sich nicht um zwitterionische Gruppen, deren Ladungen sich teilweise gegenseitig kompensieren, sondern um räumlich vollständig getrennte Anionen- und Kationenaustauschergruppen, die die geladenen Analyten retardieren.

Im Vergleich zu den oben beschriebenen Säulen ist auf den verbleibenden fünf Säulen für die Standards eine Retentionszeit zwischen 3 und 30 Minuten zu verzeichnen (Abbildung 26). Bei den Säulen handelte es sich um die Silicaphase, die Diolphase, die zwei zwitterionischen Phasen und die Amidphase. Die Retentionsreihenfolge der einzelnen Substanzgruppen auf den Säulen folgte dem durch den Verteilungsmechanismus vorgegebenen Muster, entsprechend ihrer Ladung [72]. Auf allen Säulen wurden zunächst das hydrophobe Phenylalanin und das neutrale (zwitterionische) Alanin eluiert. Zuletzt wurde das zweifach negativ geladene Citrat eluiert. Die einfach geladenen Substanzen eluierten zwischen den neutralen Analyten und dem Citrat. Die Unterschiede der verwendeten Materialien zeigen sich in der Trennung der einfach positiv und negativ geladenen Substanzen.

Die stärkste Retention und gleichzeitig die stärkste Auftrennung der Substanzen zeigte die polare Amidphase. Ihre Carbamoylgruppen bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus, die im Vergleich zu einer einfachen Diol- oder Aminogruppe sehr stark sind, da der Carbamoyl-Sauerstoff einen negativen induktiven Effekt bewirkt, der das H-Atom besonders acide macht. Die Amidsäule weist eine abweichende Reihenfolge der Analyten im Vergleich zu zwitterionischen und Diolphasen auf. Wie auf der Silicaphase eluiert hier das positiv geladene Histidin nach den einfach negativen Analyten. Dabei spielen elektrostatische Wechselwirkungen freier Silanolgruppen des Silica-Trägermaterials eine Rolle, deren Einfluss bereits für positiv geladene Analyten auf der Amid-80-Säule berichtet wurde [141-142, 158].

Auf der Silicaphase war die Retention ähnlich wie auf der Diolphase wesentlich geringer als auf der Amidphase. Die einfach positiv geladenen Substanzen wurden stärker retardiert als die einfach negativen, was auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Analyten und den negativen Ladungen der freien Silanolgruppen und die gleichzeitige Abstoßung der negativen

Analyten zurückzuführen ist [146]. Die freien Silanolgruppen sind beim vorliegenden pH-Wert dissoziiert, aber durch die immobilisierte Wasserschicht teilweise abgeschirmt. Jedoch ist die Wasserschicht auf Silicaphasen dünner als auf zwitterionischen [159] oder Diolphasen [147], wodurch die elektrostatischen Wechselwirkungen trotzdem zum Tragen kommen. Die Auftrennung der Standardsubstanzen gelang auf der Silicasäule nur teilweise. Einfach geladene Substanzen wie Glutaminsäure, Glutathion und Arginin koeluierten.

Die geringere Retention der Analyten auf der Diolphase (quervernetzte Diolgruppen) im Vergleich zur Amidphase ist auf die wesentlich geringere Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Die Auftrennung der Analyten war auf der Diolsäule besser als auf der Silicaphase. Während auf der Diolphase nur die sehr ähnlichen Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure koeluierten, sind es auf der Silicaphase neben Glutaminsäure auch Glutathion und Arginin. Das auf der Amid- und der Silica-Phase sehr spät eluierte Histidin wird auf der Diolphase, wie auch auf den zwitterionischen Phasen, mit den einfach negativen Analyten eluiert. Das zeigt, dass keine nennenswerten elektrostatischen Wechselwirkungen für die Retention der Analyten verantwortlich sind, sondern der Punkt ist die Verteilung. Daher ähnelt die Elutionsreihenfolge der Diolsäule der auf den zwitterionischen Säulen. Die Diolphase bildet wie auch die Sulfobetainphasen ebenfalls eine im Vergleich zu Silicaphasen dickere Wasserschicht [147].

Die beiden zwitterionischen Säulen zeigen eine ähnliche, wenn auch nicht vollkommen gleiche Retention, deren Stärke zwischen der Amidphase und der Diol-, bzw. Silicaphase liegt. Diese Tendenzen bestätigen die Erwartungen aus ähnlichen Säulenvergleichen [152]. Bei den zwitterionischen Säulen liegt bei neutraler Gesamtladung wegen der Ausrichtung der funktionellen Gruppen (Sulfonsäuregruppen außen) eine schwach negative Oberflächenladung vor, die schwache elektrostatische Wechselwirkungen zeigt. Die Auftrennung der Analyten ist auf der Zic-HILIC-Säule besser als auf der Nucleodur-HILIC-Säule, wo sämtliche einfach geladene Analyten innerhalb von ca. 90 s eluieren. Auf den zwitterionischen Säulen ist trotz der leicht negativen Oberflächenladung keine besonders starke Retention der positiven Analyten durch elektrostatische Wechselwirkungen zu sehen. Der Grund dafür liegt in der Ausbildung einer dickeren immobilisierten Wasserschicht im Vergleich zu Silicaphasen [159], durch die der Verteilungsmechanismus gegenüber den elektrostatischen Wechselwirkungen überwiegt.

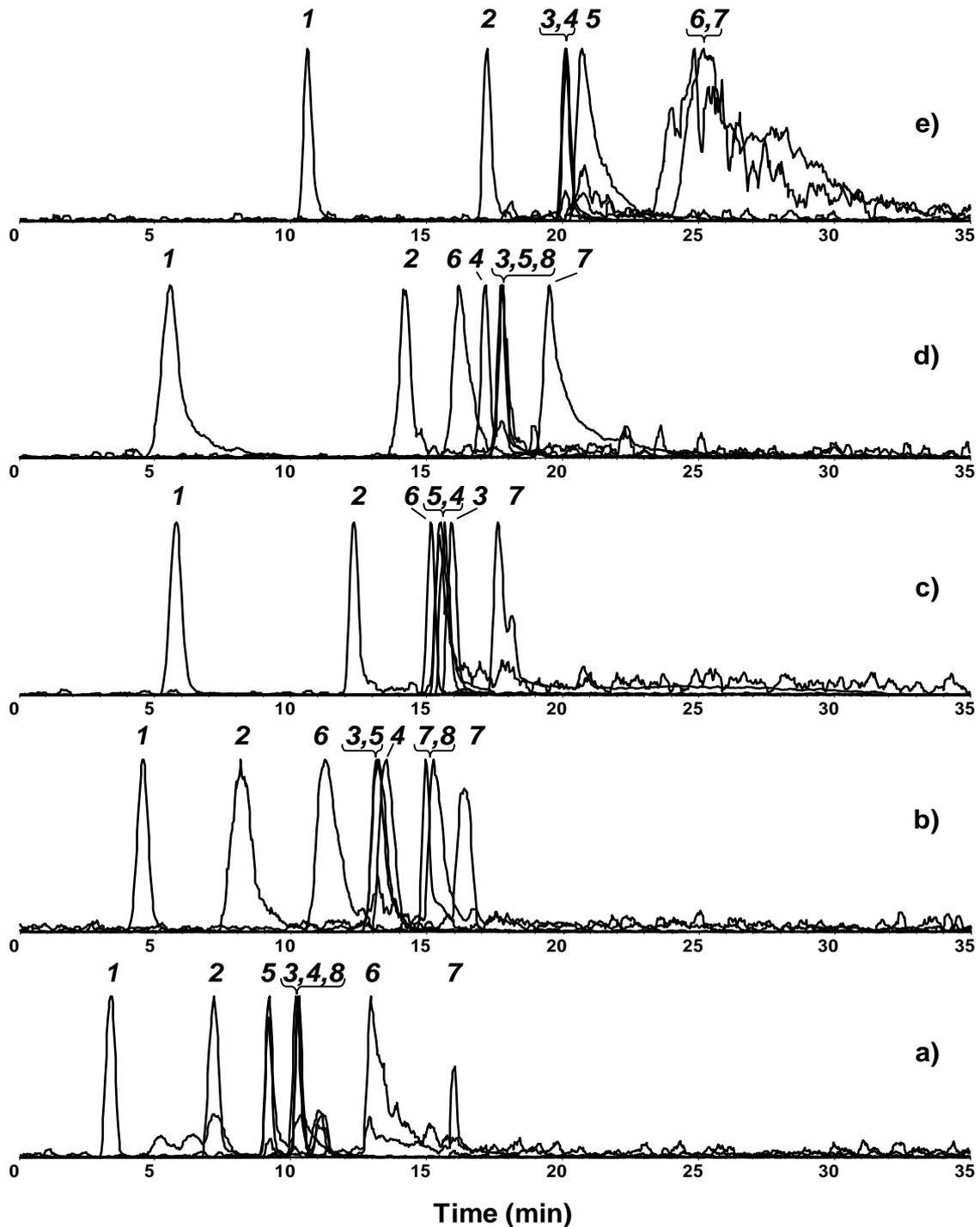


Abbildung 26: Retentionsverhalten von Standardmetaboliten (1) Phenylalanin, 2) Alanin, 3) Glutaminsäure, 4) Glutathion, 5) Asparaginsäure, 6) Histidin, 7) Citrat 8) Arginin; Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$) auf verschiedenen HILIC-Säulenmaterialien (a) Kinetex HILIC (Silicaphase), b) Luna HILIC (Diolphase), c) Macherey-Nagel (zwitterionische Sulfobetainphase), d) Zic HILIC (zwitterionische Sulfobetainphase), e) Amide-80 (Amidphase)); pH-Wert 5,5; 10 mM NH_4Ac ; Gradient von 99 % ACN, 1 % H_2O bis 45 % ACN, 55 % H_2O (Bedingungen siehe Material und Methoden)

Somit wurden Säulen mit verschiedenen Säuleneigenschaften identifiziert, die alle geeignet sind, die Standardsubstanzen unter den vorgegebenen Bedingungen weitestgehend zu trennen. Die Standards decken den vermuteten Polaritätsbereich der Metallkomplexe und ein breites Spektrum unterschiedlicher Funktionalitäten ab. Die tatsächliche Eignung der Säulenmaterialien für die Trennung der Metallkomplexe muss im Weiteren verifiziert werden.

Da die bisher getroffene Auswahl noch zwei zwitterionische Säulen umfasst, die die gleichen Sulfobetain-Funktionalitäten tragen und sehr ähnliche Trenneigenschaften besitzen, ist es sinnvoll, nur eine der Säulen weiter zu verwenden. Die Nucleodur-HILIC-Säule zeigt eine geringere Retention und trennt die Substanzen weniger effektiv als die Zic-HILIC-Säule. Für die Zic-HILIC-Säule existieren darüber hinaus bereits Erfahrungen für die Trennung stabiler Metallkomplexe [37, 145]. Deshalb wurde die Zic-HILIC-Säule für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Auch die Diol- und die Silicaphase zeigten eine miteinander vergleichbare Retentionsstärke. Die Diolphase trennte die einfach geladenen Substanzen jedoch breiter auf als die Silicaphase. Darüber hinaus bergen die freien Silanolgruppen eine große Gefahr für Metalladsorption, was bei der Anwendung für Metallkomplexe ungünstig ist [135, 160]. Daher wurde die Silicaphase für die weiteren Untersuchungen nicht mehr weiterverwendet.

Neben der Diol- (Luna HILIC) und der Sulfobetainphase (Zic HILIC) wurde die Amidphase (Amide-80) für die Untersuchung des Trennverhaltens von Metallspezies gewählt. Unter den gegebenen Trennbedingungen dominiert auf der Zic-HILIC-Säule und der Luna-HILIC-Säule der Verteilungsmechanismus. Die Amidsäule zeigt neben starken Wasserstoffbrückenbindungen geringe elektrostatische Wechselwirkungen freier Silanolgruppen, die die Trenneigenschaften besonders für positive Analyten beeinflussen [150]. Die Amidphase zeigt die stärkste Retention der Standards und eine gute Auftrennung über den gesamten Retentionsbereich.

Trennung von Fe(III)-EDTA auf 3 verschiedenen Säulen

Bevor die Trennung labiler Metallkomplexe auf den ausgewählten Säulen getestet wurde, wurde das Trennverhalten von nicht-kovalenten Metallkomplexen am Beispiel eines bekanntermaßen auch bei Trennungen stabilen Eisen-Komplexes untersucht. Dazu wurde der stabile [37] Eisen-EDTA-Komplex von freiem EDTA getrennt ($\log k(\text{Fe(III)-EDTA}) = 25,7$ [137]; EDTA: $\text{pK}_1 = 1,15$; $\text{pK}_2 = 1,15$; $\text{pK}_3 = 2,21$; $\text{pK}_4 = 2,57$;

$pK_5 = 6,16$; $pK_6 = 10,26$ [161]). EDTA ist ein Eisenligand, der in Düngemitteln Verwendung findet und ausschließlich 1:1-Komplexe mit Eisen ausbildet. Der freie Ligand liegt unter den vorgegebenen pH-Bedingungen (pH 5,5) in der zweifach negativen Form mit vier deprotonierten Carboxygruppen und zwei protonierten Stickstoffen vor. Bei der Komplexierung von Metallen wird ein sechsfach koordinierter Chelatkomplex gebildet. Die Stickstoffe sind deprotoniert, so dass die freien Elektronenpaare zu der Koordinierung des Metalls beitragen [161]. Der entstehende Fe(III)-Komplex ist somit einfach negativ geladen.

Somit ist der stabile Fe(III)-EDTA-Komplex theoretisch ein geeigneter Standard, um das Trennverhalten von Metallkomplexen auf den Säulen zu beurteilen, bevor labile Komplexe untersucht werden, von denen weder die Stabilität noch das Trennverhalten bekannt ist. Da EDTA außerdem als Testsubstanz für auf der Säule adsorbiertes Eisen dient, ist es notwendig das Trennverhalten des freien Liganden und des Fe(III)-EDTA-Komplexes zu kennen.

Folgende Punkte mussten unter den gegebenen Trennbedingungen untersucht werden:

- I) Retention des Fe-(III)-EDTA-Komplexes bei der Chromatographie auf den Säulen
- II) Stabilität des Komplexes während der Trennung unter den gegebenen Trennbedingungen
- III) Eindeutige Detektion

Auf allen drei Säulen war der Fe(III)-EDTA-Komplex während der Trennung stabil und wurde vom freien Liganden getrennt. Die MS-Detektion ermöglichte eine eindeutige Identifizierung des unzerstörten Komplexes.

Die Auftrennung war auf der zwitterionischen Säule am besten und gleichzeitig war die Retention für den Komplex am stärksten. Das entspricht den Ergebnissen früherer Arbeiten [37, 69]. Die Amidsäule zeigt fast die gleiche Retention des Komplexes, aber eine geringere Trennung der Signale. Eine wesentlich schlechtere Retention zeigt dagegen die Diolphase. Auf der Amidsäule und der Sulfobetainsäule eluiert der freie Ligand vor dem Komplex, auf der Diolsäule dagegen eluiert zuerst das Fe(III)-EDTA.

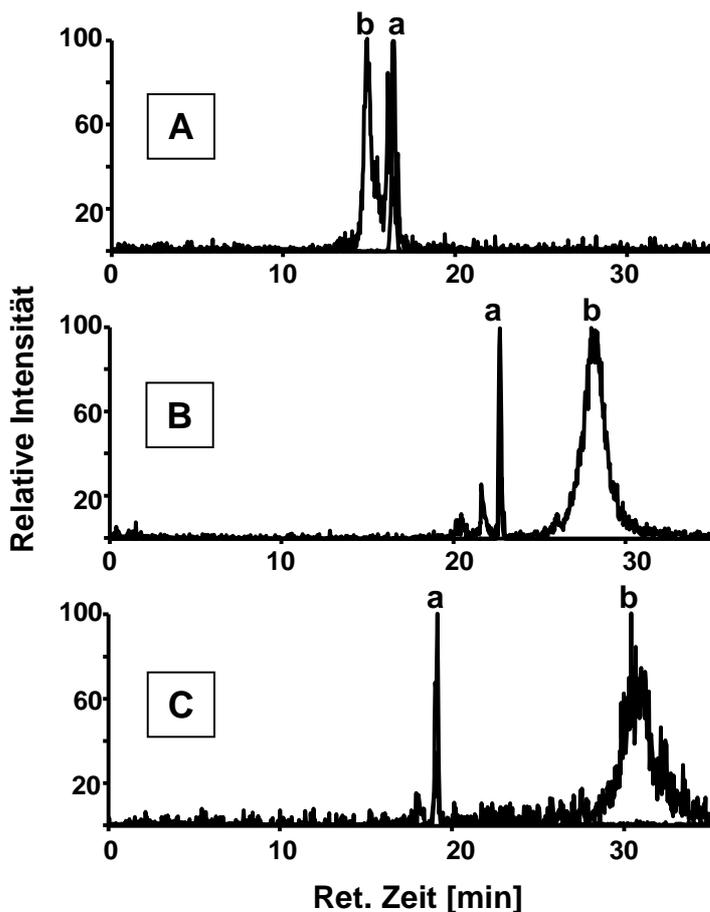


Abbildung 27: Chromatographische Trennung von a) freiem EDTA und b) Fe(III)-EDTA auf A) Luna-HILIC, B) Amide-80 und C) Zic-HILIC

Die zwitterionische Sulfobetainphase bildet schwache elektrostatische Wechselwirkungen durch die an der Oberfläche liegende Sulfonsäuregruppe aus, die abstoßend auf die negative Ladung der Säuregruppen des EDTA wirken. Der Fe(III)-Komplex besitzt im Gegensatz dazu das Eisen, das zum einen durch die Koordination die negativen Ladungen des EDTA ausgleicht, zum anderen als positives Zentrum mit den negativen Sulfonsäuregruppen interagieren kann. Daraus resultiert die starke Auftrennung von Komplex und Ligand.

Die Amidphase kann durch den negativen induktiven Effekt des Carbamoyl-Sauerstoffes starke Wasserstoffbrücken ausbilden. Der azide Wasserstoff interagiert mit den Sauerstoffen des freien Liganden wie auch des Komplexes. Der Komplex besitzt jedoch im Gegensatz zum freien Liganden ($pK_1 = 1,15$; $pK_2 = 1,15$; $pK_3 = 2,21$; $pK_4 = 2,57$; $pK_5 = 6,16$; $pK_6 = 10,26$ [161]) zwei H-Akzeptoren mehr durch den Verlust der Protonierung an den beiden Stickstoffatomen. Damit ist die Retention

für den Komplex stärker als für den Liganden.

Die Diolphase besitzt quervernetzte Diolgruppen, die lediglich sehr schwache Wasserstoffbrücken ausbilden können [72, 146]. Diese leisten daher wenig oder keinen Beitrag zur Retention des EDTA und Fe(III)-EDTA, so dass hier der reine Verteilungsmechanismus dominiert. In dem Fall wird die Reihenfolge der Elution von der Ladung der Moleküle beeinflusst. Da der Komplex nur eine einfache Nettoladung besitzt, der freie Ligand dagegen zweifach negativ geladen ist, ist hier die Retentionsreihenfolge umgekehrt und der Komplex eluiert vor dem freien Liganden.

Dieser unerwartete Effekt der umgekehrten Retentionsreihenfolge zeigt deutlich die Selektivitätsunterschiede der Trennsäulen. Dadurch wird die Auswahl der Säulenmaterialien bestätigt.

6.2.3 Identifizierung von biologisch interessanten Metallkomplexen

Nachdem die Trenneigenschaften des stabilen Fe(III)-EDTA-Komplexes auf den drei HILIC-Säulen untersucht wurden, waren die Voraussetzungen geschaffen, labile Metallkomplexe zu untersuchen. Ein zentraler Punkt in dieser Arbeit ist die Untersuchung des Eisen-Citrat- und des Kupfer-Histidin-Systems.

Als Voraussetzung für die Untersuchung der Trenneigenschaften muss die Identität der Metallspezies bekannt sein. Für das Eisen-Citrat-System existieren bereits Untersuchungen, die die Komplexizität und Variabilität der Spezies-Zusammensetzung zeigen [26-27]. Für das Kupfer-Histidin-System wurde bisher der CuHis₂-Komplex in verschiedenen Ladungsformen und Koordinationen identifiziert [124-126, 162-163]. Da es über die Lage der Speziesgleichgewichte unter den gewählten Messbedingungen keine Informationen gab, wurden die Spezies in den Modellmischungen vor Beginn der Untersuchungen zum Trennverhalten identifiziert.

Die Modellmischungen wurden danach der Trennung auf den drei ausgewählten HILIC-Säulen unterzogen, um das Trennverhalten der zuvor identifizierten Spezies zu untersuchen und ggf. Speziesänderungen während der Trennung festzustellen. Im nächsten Schritt wurden der Einfluss der Pflanzenmatrix auf die Trennbarkeit und Stabilität der Komplexe anhand von angereicherten Proben und die Anwendbarkeit auf Originalproben untersucht.

Als komplementäre Trenntechnik wurde CE eingesetzt, um offene Fragen zu beantworten, die mit den HPLC-Untersuchungen nicht zu klären waren.

Identifizierung von labilen Metallkomplexen in Modellmischungen

Um das Trennverhalten labiler Metallspezies beurteilen zu können, wurden Modellmischungen mit definierter Spezieszusammensetzung benötigt.

Ziel ist die Untersuchung von Metallspezies bei pH 5,5 (wie er im Xylem vorliegt). Dazu muss die Lage der Speziesgleichgewichte bei diesem pH-Wert bekannt sein. Dieses Gleichgewicht ist von den physikalisch-chemischen Bedingungen in der Lösung abhängig und wird somit mit jeder Änderung der Bedingungen verschoben. Aus diesem Grund musste die Zusammensetzung der verwendeten Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Modellmischungen (s. Kapitel 3.1.3) zunächst untersucht und die enthaltenen Spezies identifiziert werden.

Zur Untersuchung der Spezieszusammensetzung von Eisen-Citrat-Mischungen gibt es bisher wenige Arbeiten [26-27, 136], in denen die Abhängigkeit von pH-Wert und dem Verhältnis von Citrat zu Eisen untersucht wurde.

Die für die Identifizierung gewählten Messbedingungen entsprechen den Gegebenheiten, unter denen die Spezies in der Pflanze vorliegen. Dazu gehört die Wahl des pH-Wertes mit 5,5 (was dem Xylem-pH entspricht) und die Verwendung eines Ligandenüberschusses.

ESI-MS-Direktinfusionsmessung einer Eisen-Citrat-Modellmischung

Bei der Direktinfusion der Eisen-Citrat-Mischung wurden insgesamt elf unterschiedliche Spezies identifiziert. Darunter waren vier unterschiedliche Stöchiometrien zu finden (1:2, 2:2, 3:3, 3:4), die in verschiedenen Ladungszuständen vorlagen. Eine Übersicht der gefundenen Spezies bietet Tabelle 8, das Chromatogramm der Direktinfusion ist in Abbildung 28 dargestellt. Die Zuordnung der Massen zu den Spezies erfolgte in Anlehnung an [26-27].

Tabelle 8: Übersicht über die in Direktinfusionsexperimenten mit Niedrigauflösung (LCQ-Deca) gemessene Eisen-Citrat-Spezies (Spezies nach [26-27], Hauptisotop (mit ^{56}Fe), Die Abkürzung (Cit) $^{4-}$ bezieht sich auf die Summenformel $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7^{4-}$

Spezies	Formel	m/z (berechnet)	m/z (gemessen)
$[\text{Fe Cit}_2]^{2-}$	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_{14}\text{Fe}^{2-}$	217,5	217,5
$[\text{Fe}_2 \text{Cit}_2]^{2-}$	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_{14}\text{Fe}_2^{2-}$	243,9	243,9
$[\text{Fe}_3 \text{Cit}_3]^{2-}$	$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{O}_{21}\text{Fe}_3^{2-}$	366,4	366,4
$[\text{Fe}_3 \text{Cit}_3 (\text{H}_2\text{O})]^{2-}$	$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_{22}\text{Fe}_3^{2-}$	375,9	375,9
$[\text{Fe Cit}_2]^{-}$	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_{14}\text{Fe}^{-}$	435,9	435,9
$[\text{Fe}_3 \text{Cit}_4]^{2-}$	$\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{O}_{28}\text{Fe}_3^{2-}$	462,4	462,4
$[\text{Fe}_2 \text{Cit}_2]^{-}$	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_{14}\text{Fe}_2^{-}$	488,9	488,9
$[\text{Fe}_2 \text{Cit}_3]^{-}$	$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_{21}\text{Fe}_2^{-}$	680,9	680,9
$[\text{Fe}_3 \text{Cit}_3]^{-}$	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_{21}\text{Fe}_3^{-}$	733,8	733,8
$[\text{Fe}_3 \text{Cit}_3 (\text{H}_2\text{O})]^{-}$	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_{22}\text{Fe}_3^{-}$	751,8	751,8
$[\text{Fe}_3 \text{Cit}_4]^{-}$	$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_{28}\text{Fe}_3^{-}$	925,8	925,8

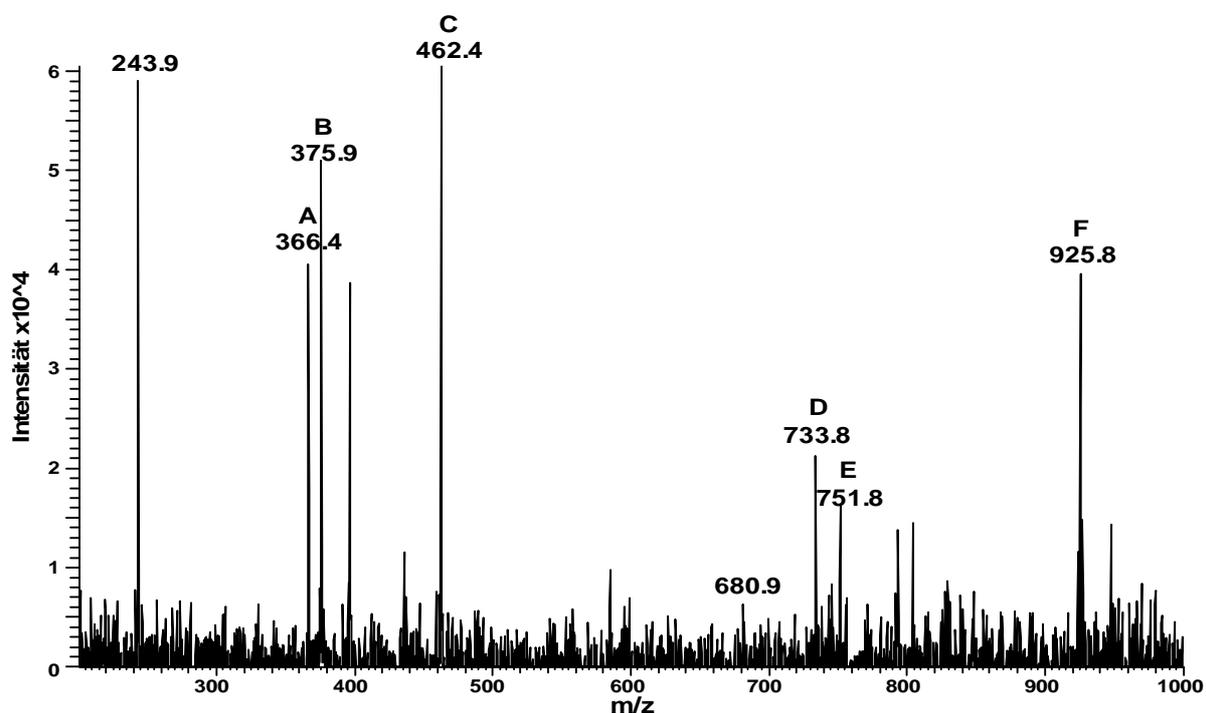


Abbildung 28: Chromatogramm der Direktinfusion einer Eisen-Citrat-Mischung mit 1 mM Eisen(III) und 2 mM Zitronensäure bei einem pH Wert von 5,5, Die Abkürzung (Cit) $^{4-}$ bezieht sich auf die Summenformel $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7^{4-}$

Es wurden insgesamt vier Ladungszustände eines 3:3-Eisen-Citrat-Komplexes identifiziert, mit einfach und zweifach negativer Gesamtladung ($[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3]^-$ mit $m/z=733,8$ und $[\text{Fe}_3\text{Cit}_3]^{2-}$ mit $m/z=366,4$), genauso wie ein 3:3-Komplex mit einem Molekül Wasser, der ebenfalls einfach und zweifach negativ geladen vorliegt ($[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3 (\text{H}_2\text{O})]^-$ mit $m/z=751,8$ und $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3 (\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ mit $m/z=375,9$).

Die Signale mit $m/z=462,4$ und $m/z=925,8$ entsprechen Spezies mit einer 3:4 Stöchiometrie mit einfach negativer Ladung ($[\text{Fe}_3\text{Cit}_4]^-$) und zweifach negativer Ladung ($[\text{Fe}_3\text{Cit}_4]^{2-}$). Ein Komplex mit einer 2:2 Stöchiometrie konnte nur im zweifach negativ geladenen Zustand eindeutig identifiziert werden ($[\text{Fe}_2\text{Cit}_2]^{2-}$, $m/z= 243,9$) (Abbildung 28). Das Signal der einfach negativen Form mit $m/z=488,8$ konnte aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht eindeutig identifiziert werden, ebenso wie die 1:2 Spezies.

Es wurden „milde“ ESI-Ionisierungsbedingungen gewählt (s. Kapitel 5.2.3), so dass die Spezies intakt gemessen werden konnten und wenig Fragmentierungen erzeugt wurden [164]. Diese Bedingungen ermöglichen es, Komplexe mit angelagerten Addukten wie z.B. Wassermolekülen zu detektieren, die aus der Hydrathülle stammen. Auch Komplexe mit unterschiedlichen Ladungszuständen können gemessen werden, wobei diese Ladungszustände in Lösung oder beim ESI-Prozess entstehen können.

Die Analyse der Isotopenmuster ermöglicht es, die Identität der zugeordneten Komplexe zu verifizieren. Die gemessenen Isotopenmuster stimmen gut mit den simulierten Isotopenmustern überein und das durch die Eisenisotope hervorgerufene, charakteristische Muster ist gut erkennbar (Abbildung 29).

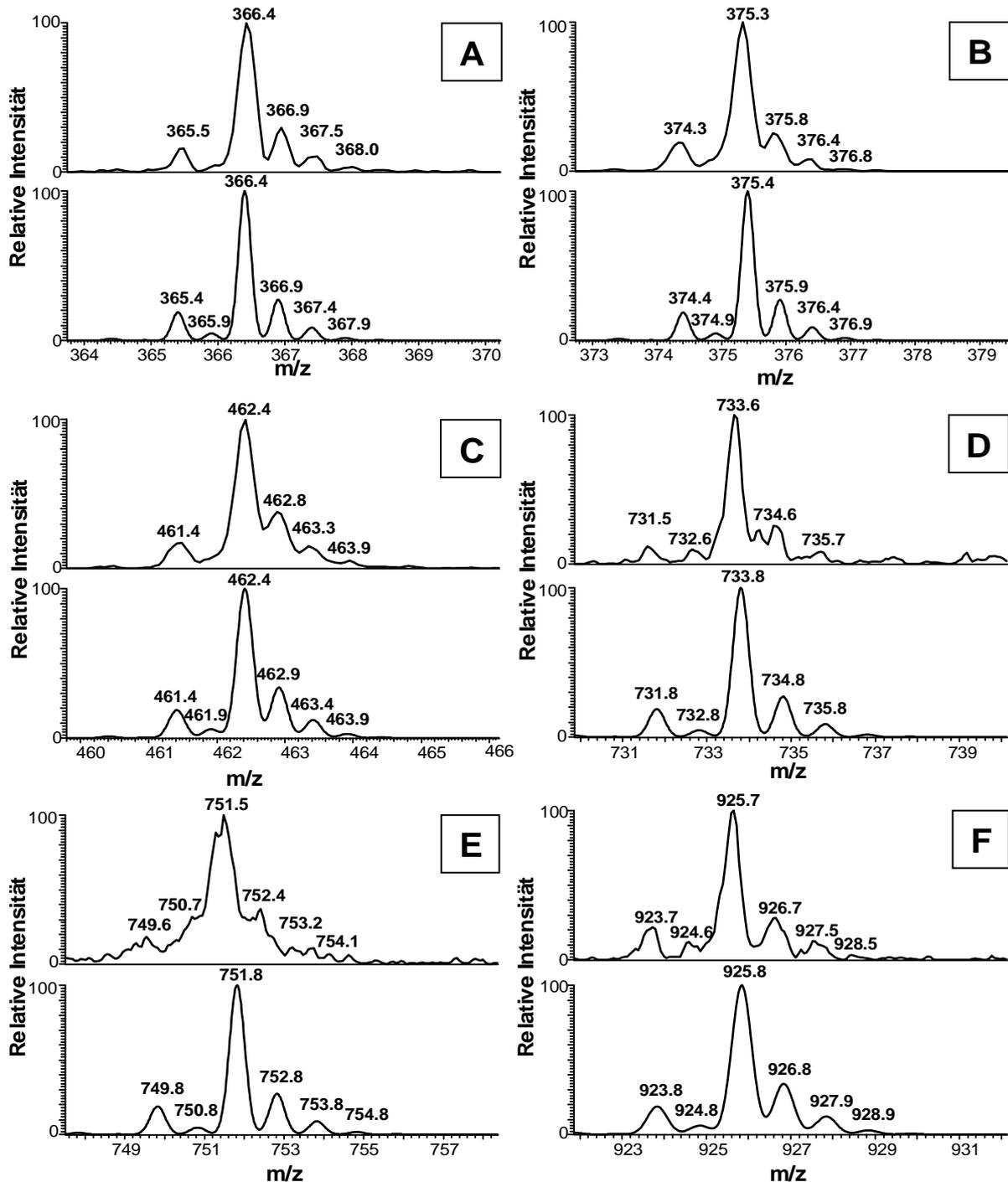


Abbildung 29: Isotopenmuster von Eisen-Citrat-Spezies, oben: gemessenes Muster, unten: mit Xcalibur simuliertes Muster; A) $[Fe_3 Cit_3]^{2-}$ $m/z=366,4$; B) $[Fe_3 Cit_3 (H_2O)]^{2-}$ $m/z=375,9$; C) $[Fe_3 Cit_4]^{2-}$ $m/z=462,4$; D) $[Fe_3 Cit_3]$ $m/z=733,8$; E) $[Fe_3 Cit_3 (H_2O)]$ $m/z=751,8$; F) $[Fe_3 Cit_4]$ $m/z=925,8$

Damit stimmen die hier identifizierten unterschiedlichen Eisen-Citrat-Spezies gut mit den Ergebnissen überein, die in den zuvor genannten Arbeiten ermittelt wurden [26-27]. Obwohl die Literaturergebnisse bei anderen pH-Werten entstanden (pH 3,5 bis

4,2 und bei neutralem pH), waren auch dort die Signale der 3:3- und der 3:4-Stöchiometrie die Spezies mit den größten Intensitäten. Nicht zu klären, aber interessant im Hinblick auf die Trennversuche, ist an dieser Stelle die Frage nach der Struktur und Stabilität der verschiedenen Stöchiometrien (insbesondere der mehrkernigen 3:3- und 3:4-Spezies), also z.B. die Frage, ob die 3:4-Stöchiometrie einfach ein (labiles) Citrat-Addukt der 3:3-Spezies ist. Um diese Fragestellung näher zu bearbeiten, wurde eine MS²-Fragmentierung der einzelnen Spezies durchgeführt.

MS²-Fragmentierung von Eisen-Citrat

Bei der Messung der MS²-Spektren wurden die intensivsten Spezies der Direktinfusionsexperimente berücksichtigt. Die bei der Fragmentierung auftretenden Hauptfragmente wurden besonders im Hinblick auf die Stabilität der Komplexe bei späteren Trennungen interpretiert. Dabei steht im Vordergrund, zu klären, ob die Spezies bereits bei geringen relativen Kollisionsenergien unter Aufspaltung der mehrkernigen Eisenzentren oder Abspaltung ganzer Citratmoleküle fragmentieren und dadurch kleinere Spezies gebildet werden. Daraus kann man Hinweise ziehen, ob die kleinen Spezies aus Bruchstücken der größeren während der Ionisierung entstehen oder als stabile Spezies im Gleichgewicht vorliegen. Dazu wurden die Fragmentierungen mit ansteigenden relativen Kollisionsenergien (KE = 10-40 %) durchgeführt. Um zu verifizieren, dass es sich bei den betrachteten Fragmenten ebenfalls um eisenhaltige Spezies handelt, wurden ergänzende Messungen durchgeführt. Dabei wurde die Erfassungsbreite der Ausgangsspezies so gewählt, dass alle Eisenisotope bei der Fragmentierung mit erfasst wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass auch die Fragmente noch das Isotopenmuster der eisenhaltigen Spezies aufwiesen, was bedeutet, dass das Eisen nach wie vor fest im Komplex gebunden war.

Bei der Fragmentierung von Citrat im ES-MS² im negativen Modus wurde in der Literatur ein Fragment detektiert, das auf die Abspaltung von H₂O und CO₂ zurückzuführen ist [165]. Auch für die Fragmentierung von Sb-Citrat-Komplexen und Ni-Citrat-Komplexen wurden CO₂-, H₂O- und HCOOH-Abspaltungen dokumentiert [34, 166].

Die [Fe₃ Cit₃]²⁻-Spezies mit m/z = 366,4 zeigte eine Fragmentierung mit m/z=300,4, das einem Verlust von 3 CO₂-Molekülen entspricht (Abspaltung m/z = 132). Das korreliert

mit einer der postulierten [26] Strukturen der 3:3-Spezies (Abbildung 33), die durch die nach außen gerichtete räumliche Ausrichtung der CO₂-Gruppen eine Abspaltung wahrscheinlich macht. Weitere Fragmente entstehen durch Abspaltung von CO₂, H₂O und Ameisensäure (m/z = 272) bei hoher Kollisionsenergie (40 %).

Somit handelt es sich bei dem 3:3-Komplex um eine relativ stabile Spezies, die unter den hier verwendeten Kollisionsenergien nicht unter Bildung anderer Eisen-Komplexe fragmentiert.

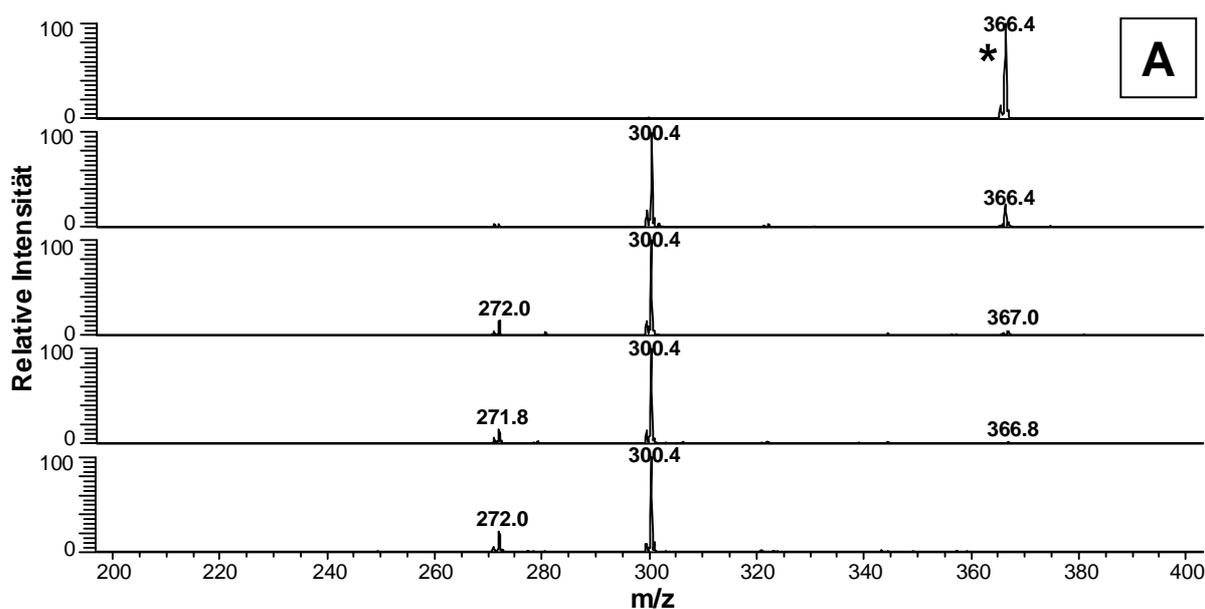


Abbildung 30: MS² von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) A) [Fe₃ Cit₃]²⁻ m/z=366,4; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten)

Die Spezies [Fe₃ Cit₃ (H₂O)]²⁻ mit m/z=375,9 zeigte erwartungsgemäß bereits bei niedriger Kollisionsenergie die Abspaltung von Wasser zur [Fe₃ Cit₃]²⁻-Spezies (Abbildung 31). Erst bei 40 % Kollisionsenergie findet man auch die charakteristischen Fragmente der [Fe₃ Cit₃]²⁻-Spezies (s.o.). Die einfache Abspaltung des Wassermoleküls zeigt, dass es sich beim Ausgangskomplex um die [Fe₃ Cit₃]²⁻-Spezies mit einem nur lose gebundenen Wassermolekül handelt. Das ist auf die milde Ionisation mit ESI zurückzuführen, die die Detektion derartiger Addukte ermöglicht [164]. Die Stabilität der 3:3-Spezies zeigt sich darin, dass es erst bei hoher Kollisionsenergie zur Fragmentierung kommt.

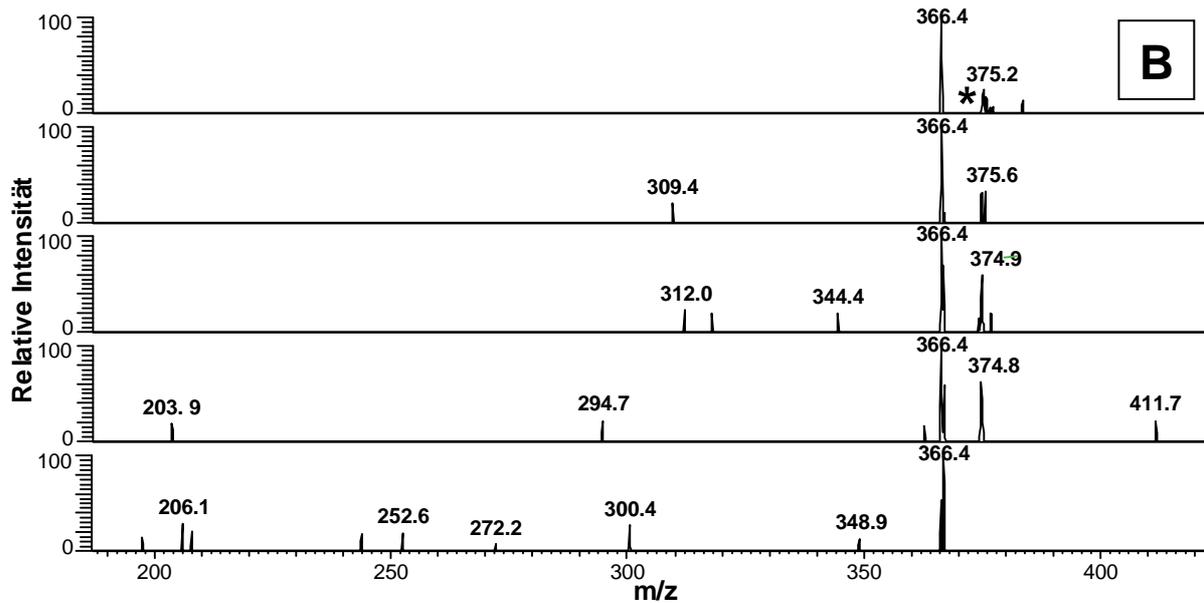


Abbildung 31: MS^2 von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) $[Fe_3 Cit_3 (H_2O)]^{2-}$ $m/z=375,9$; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten)

Die Spezies $[Fe_3 Cit_3]^-$ mit $m/z = 733,8$ fragmentierte unter Abspaltung von Wasser und CO_2 zum Fragment mit $m/z = 671,2$ (Abbildung 32).

Das dominante Fragment mit $m/z = 543,6$, entspricht einem Produkt aus der Abspaltung von einem zweifach negativen Citratmolekül mit der Masse 190 u und einer gleichzeitigen Reduktionsreaktion. Reduktionsreaktionen sind im negativen Ionisationsmodus wahrscheinlich, die hier ablaufende Nebenreaktion ist ungeklärt.

Die Fragmente mit $m/z=499,7$ bzw. $456,0$ entsprechen dann der Abspaltung von einem bzw. zwei Molekülen CO_2 vom oben genannten Fragment ($m/z = 543,6$).

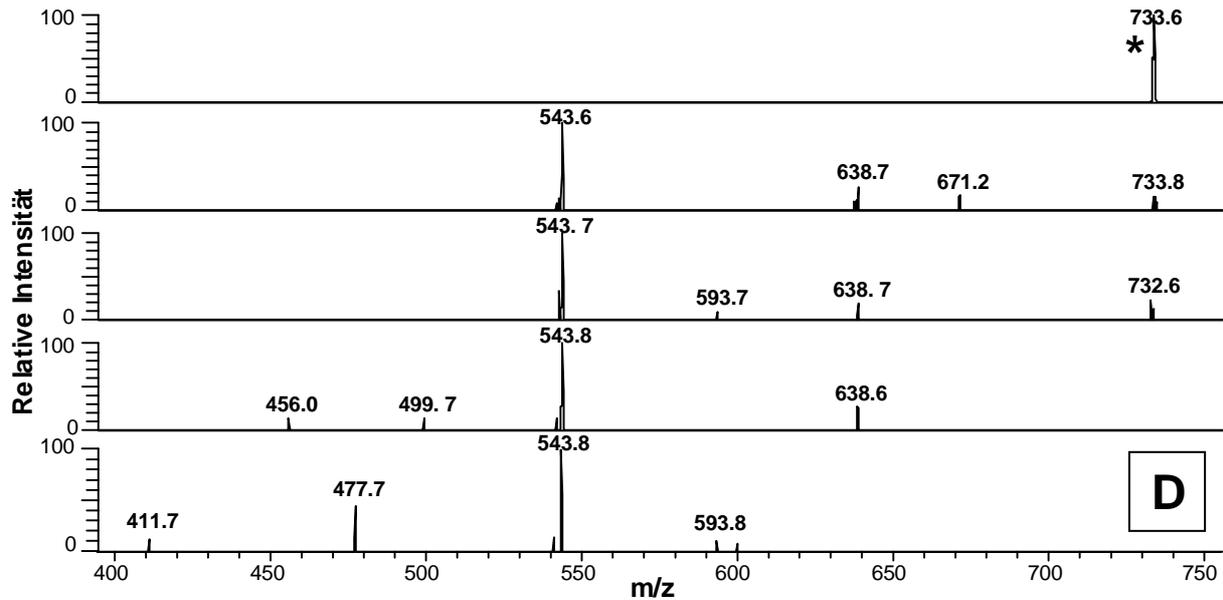


Abbildung 32: MS^2 von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) D) $[Fe_3 Cit_3]^-$ $m/z=733,8$; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten)

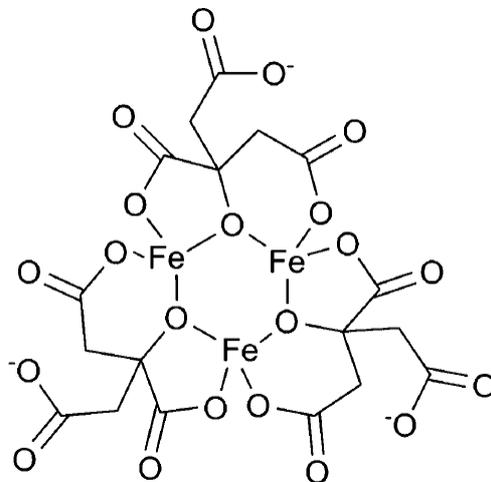


Abbildung 33: Eine Struktur des $[Fe_3 Cit_3]^-$ -Komplexes ($m/z=733,8$) in wässriger Lösung nach [26]

Die $[Fe_3 Cit_3 (H_2O)]^-$ -Spezies mit $m/z = 751,8$ zeigte die einfache Abspaltung von Wasser zum $[Fe_3 Cit_3]^-$ -Komplex mit $m/z = 733,8$. Außerdem war ein Fragment mit $m/z = 663,1$ messbar, das einer Abspaltung von 2 Molekülen CO_2 entspricht (Abbildung 34). Auch für den einfach geladenen 3:3-Komplex mit einem Molekül Wasser waren keine Aufspaltungen in kleinere Komplexe zu beobachten, was den Ergebnissen aus der Fragmentierung des einfach geladenen Komplexes entspricht

und ebenfalls für eine hohe Stabilität des Komplexes spricht.

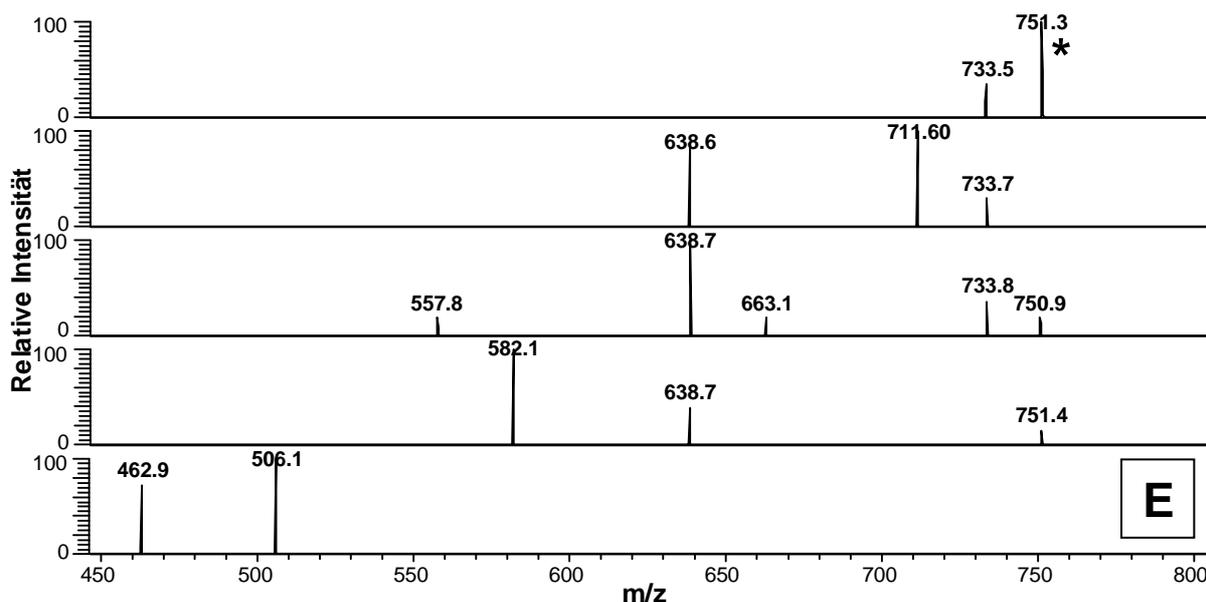


Abbildung 34: MS^2 von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) E $[Fe_3 Cit_3 (H_2O)]^-$ $m/z=751,8$; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten)

Von der zweifach geladenen Spezies mit 3:4-Stöchiometrie $[Fe_3 Cit_4]^{2-}$ mit $m/z=462,4$ wurde bereits bei 15 % normierter Kollisionsenergie ein Molekül Citrat abgespalten. Unter Verlust eines neutralen Moleküls Citrat ($C_6H_8O_7$; 192,0 u) entsteht $[Fe_3 Cit_3]^{2-}$ mit $m/z = 366,4$, beim Verlust eines einfach negativ geladenen Moleküls Citrat ($m/z = 191,0$) wird die einfach geladene Spezies $[Fe_3 Cit_3]^-$ mit $m/z = 733,6$ gebildet. Die Fragmentationen 436,0 und 488,6 repräsentieren die Spaltprodukte $[Fe Cit_2]^-$ und $[Fe_2 Cit_2]^-$. Sie wurden ebenfalls bereits bei 15 % Kollisionsenergie gebildet.

Somit wurde gezeigt, dass die 3:4-Spezies im Gegensatz zur 3:3-Spezies bei geringen Kollisionsenergien bereits auf zwei Wegen unter Bildung kleinerer Stöchiometrien in die 1:2- und 2:2-Spezies oder in die 3:3-Spezies und ein Molekül Citrat fragmentieren. Die entstehenden Spezies entsprechen denen, die auch in der Direktmessung gefunden wurden. Besonders bei diesen Spezies musste bei weiteren Untersuchungen darauf geachtet werden, ob sie aus einer Dissoziation der 3:4-Spezies entstanden sein könnten.

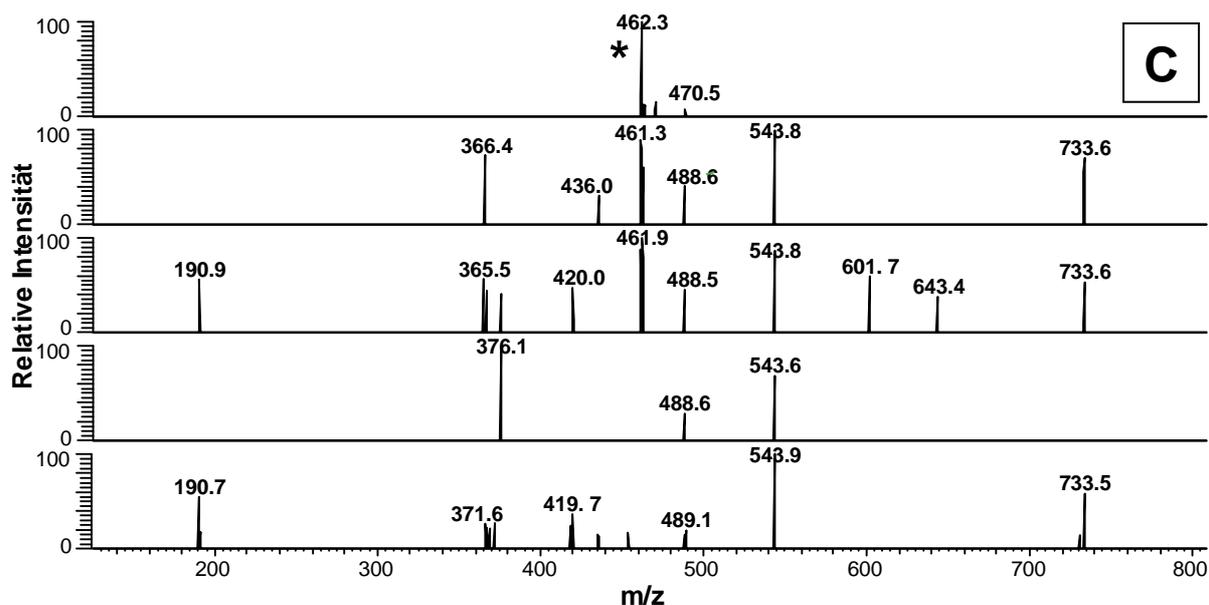


Abbildung 35: MS^2 von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) C) $[Fe_3 Cit_4]^{2-}$ $m/z=462,4$; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten)

Bei der Fragmentierung des $[Fe_3 Cit_4]^-$ -Komplexes (Abbildung 36) mit $m/z = 925,8$ konnte eine Wasserabspaltung gemessen werden, die dem Fragment mit $m/z = 907,5$ entspricht. Auch die Abspaltung eines Citrates zum 3:3-Komplex ($m/z = 751,6$) war zu messen, wie beim zweifach negativen 3:4-Komplex.

Die Fragmentierung der einfach negativen 3:4-Spezies belegt, wie auch die Fragmentierung der zweifach negativen 3:4-Spezies (s. o.), dass die 3:4-Stöchiometrie unter Bildung kleinerer Stöchiometrien, in diesem Fall nur auf einem Weg zur 3:3-Spezies, fragmentiert und somit weniger stabil ist als die 3:3-Spezies.

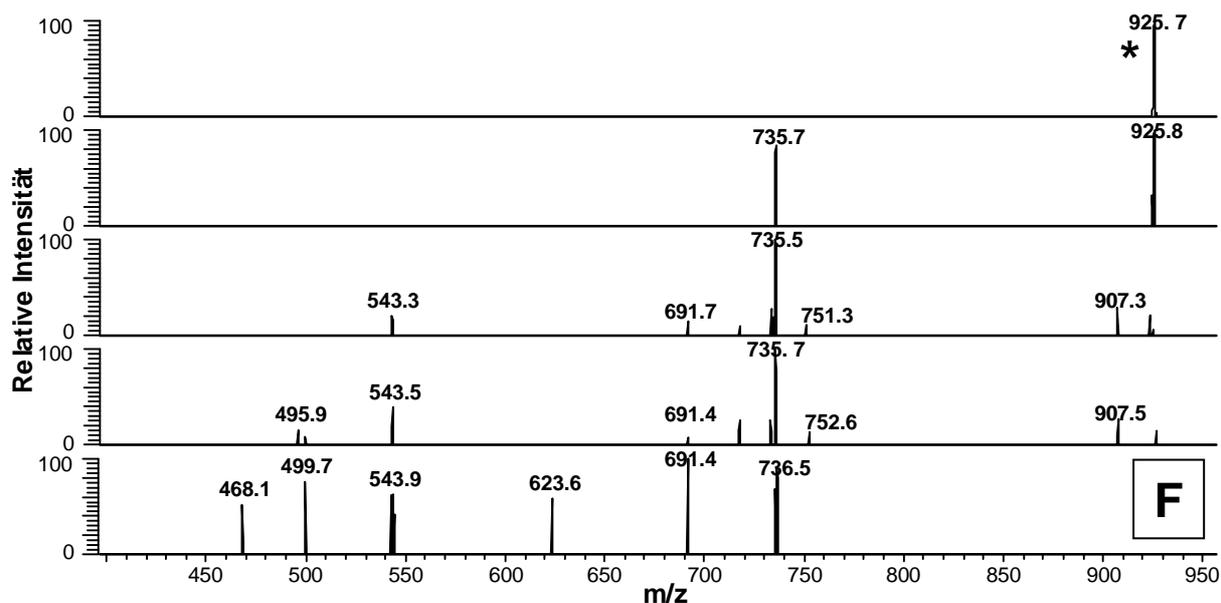


Abbildung 36: MS^2 von Eisen-Citrat-Spezies (* = Parention) F $[Fe_3 Cit_4]^-$ $m/z=925,8$; die Fragmentierung wurde mit steigender Kollisionsenergie durchgeführt (10, 15, 20, 30, 40 % normierter KE, von oben nach unten)

Die Ergebnisse der MS^2 -Versuche stehen im Einklang mit den Identifizierungen, die mit den direkten MS-Messungen erzielt wurden. Die Fragmentierungen der mehrkernigen Spezies stützten die Identität der gemessenen Stöchiometrien.

Das Fragmentierungsverhalten der 3:3- und 3:4-Spezies unterschied sich stark voneinander. Es wurde gezeigt, dass die 3:3-Spezies unter den gewählten Bedingungen nur geringe Fragmentierungen zeigen, die für Citratmoleküle zu erwarten sind, wie CO_2 - und H_2O -Abspaltungen, und bereits für Nickel- und Antimon-Spezies beschrieben wurden [34, 165-166].

Die 3:4-Spezies zeigten im Gegensatz zu den 3:3-Spezies über die CO_2 - und H_2O -Abspaltungen hinaus zwei Fragmentierungswege. Die 3:3-Spezies entstand durch die Abspaltungen eines Citratmoleküls. Der zweite Fragmentierungsweg bestand in der Aufspaltung in 1:2- und 2:2-Spezies. Beide Fragmentierungen finden nebeneinander bei geringen Kollisionsenergien (10-20% rel. Kollisionsenergie) statt. Daher musste bei weitergehenden Untersuchungen wie Trennungen darauf geachtet werden, dass die kleineren Spezies als Fragmente der 3:4-Spezies entstehen können. Um dies zu bewerten, muss das Trennverhalten der Spezies, soweit sie stabil und trennbar sind, mit einbezogen werden.

Spezieszusammensetzung abhängig vom Eisen-Citrat-Verhältnis

Labile Metallspezies liegen in einem Gleichgewicht vor, das durch Veränderung der chemischen Umgebung verschoben wird (s. oben). Für Eisen-Citrat-Spezies wurde in der Literatur die Abhängigkeit vom Verhältnis des Eisens zum Citrat beschrieben [26-27]. Im Folgenden wurde diese Abhängigkeit unter den in dieser Arbeit gewählten pH-Bedingungen (pH 5,5) untersucht. Dabei wurde der Bereich von einem äquimolaren 1:1-Verhältnis bis zu einem 1:20-Citrat-Überschuss untersucht. Es wurde gemessen, dass bei einem äquimolaren Verhältnis die stabileren 3:3-Spezies dominierten. Für die 3:4-Spezies waren bei einem 1:1-Verhältnis nur geringe Intensitäten messbar. Dieses Verhältnis kehrte sich um, sobald ein Citrat-Überschuss vorlag. Je größer der Citrat-Überschuss war, desto mehr wurde das Gleichgewicht auf die Seite der 3:4-Komplexe verschoben. Es ist logisch, dass Spezies mit relativ mehr Citrat (im Verhältnis zum Eisen) bei Citrat-Überschuss stärker gebildet werden. Diese Ergebnisse stimmten weitestgehend mit den Untersuchungen von Silva et al [26] überein, die den 3:3-Komplex mit $m/z = 375,5$ sowohl bei pH 4,5 als auch bei pH 7,4 bis zu einem Eisen-Citrat-Verhältnis von 1:4 als dominierende Verbindung einstufen. Ab einem Verhältnis von 1:10 war eine 3:4-Spezies die Hauptkomponente, bei höheren Verhältnissen eine 1:3-Verbindung, die in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen wurde.

Gautier-Luneau et al [27] fanden ähnliche Ergebnisse, wobei in deren Arbeit nur entweder sehr saure (pH 2,4 und 3,5) oder neutrale (pH 6,5 - 7,0) pH-Werte gemessen wurden. Im Neutralen ließen sich auch hier die Tendenzen von 3:3- nach 3:4-Stöchiometrien bestätigen (außerdem 1:2 bei hohen Fe-Cit-Verhältnissen).

Somit war die gemessene Gleichgewichtslage unter Berücksichtigung der unterschiedlichen pH-Bedingungen weitestgehend mit den vorhandenen Vergleichen in Einklang zu bringen [26-27].

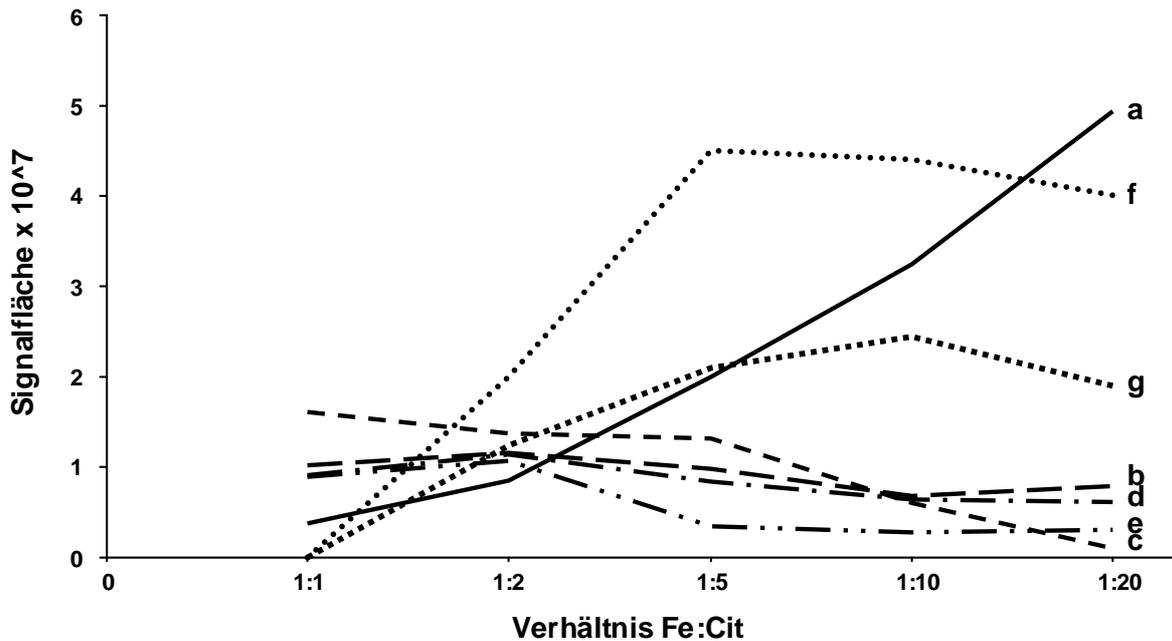


Abbildung 37: Entwicklung der Spezieszusammensetzung von Eisen-Citrat-Komplexen mit Veränderung des Verhältnisses von Eisen zu Citrat: a) freies Citrat; b) $[Fe_3 Cit_3]^{2-}$; c) $[Fe_3 Cit_3 H_2O]^{2-}$; d) $[Fe_3 Cit_3]$; e) $[Fe_3 Cit_3 H_2O]$; f) $[Fe_3 Cit_4]^{2-}$; g) $[Fe_3 Cit_4]$

Linearität bei Konzentrationsänderungen

Ziel der weiteren Untersuchungen war die vergleichende Quantifizierung von Metallkomplexen in Pflanzen (s. Kapitel 6.3). Dabei sollten die Modellmischungen als Referenzsubstanzen dienen. Da bei Trennungen unterschiedliche Konzentrationen vorliegen, musste sichergestellt sein, dass die Intensität im untersuchten Messbereich linear zur Konzentration war. Hierzu wurde der Konzentrationsbereich von 0,5–2 mM Fe/L mit jeweils doppeltem Citratüberschuss gemessen. Für alle Spezies konnte dabei eine Linearität mit mindestens $R^2 = 0,9$ bestimmt werden (Abbildung 38).

Das Ergebnis stellt sicher, dass für den zu erwartenden Konzentrationsbereich von Eisen-Citrat-Spezies in Pflanzen eine Linearität gegeben und eine vergleichende Quantifizierung möglich ist.

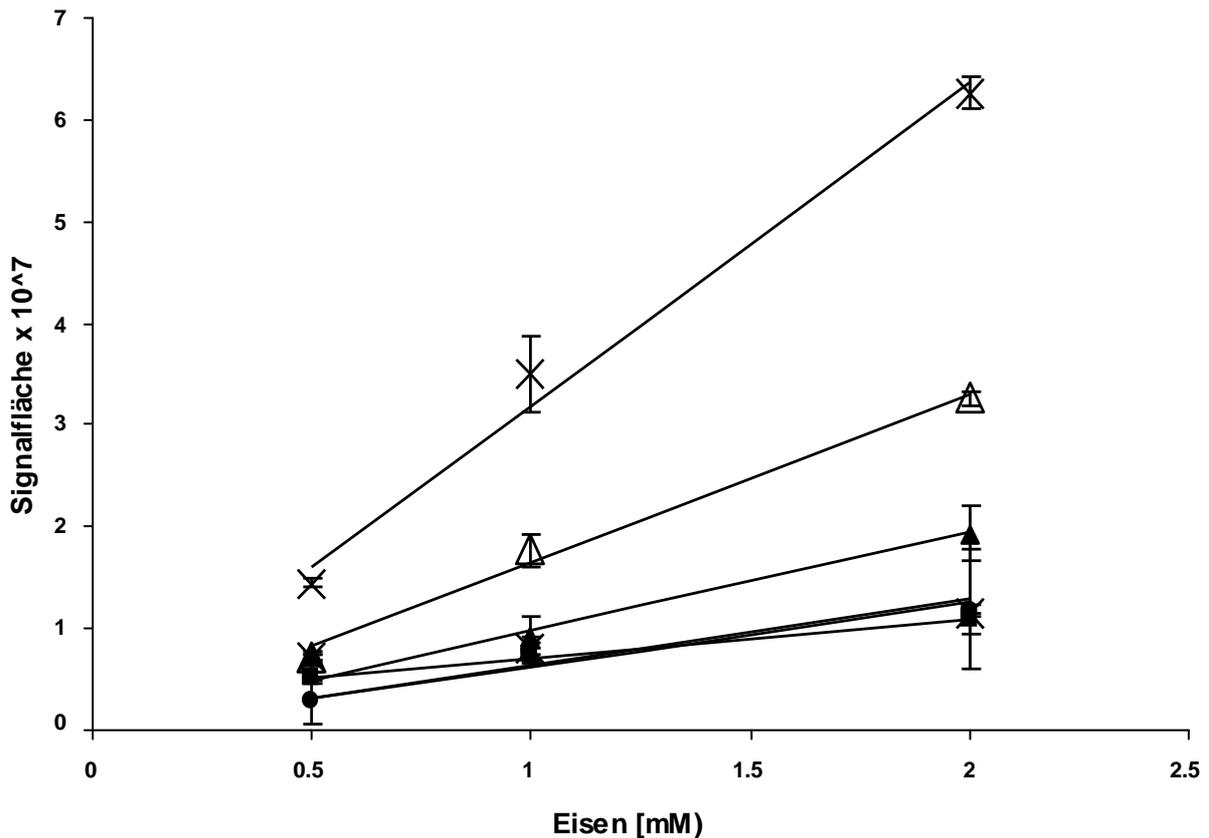


Abbildung 38: Reproduzierbarkeit und Linearität der Signallächen bei zunehmender Konzentration von Eisen und Citrat bei gleichbleibendem Verhältnis von 1/2; untersuchte Spezies: ■ [Fe₃ Cit₃]²⁻, ▲ [Fe₃ Cit₃ H₂O]²⁻, X [Fe₃ Cit₄]²⁻, ж [Fe₃ Cit₃], ● [Fe₃ Cit₃ H₂O], Δ [Fe₃ Cit₄]

Direktinfusion einer Kupfer-Histidin-Modellmischung

Analog zur Identifizierung der bei pH 5,5 vorliegenden Eisen-Citrat-Spezies wurde die Identifizierung der Kupfer-Histidin-Spezies (dem zweiten Modellsystem in dieser Arbeit) durchgeführt. In der Literatur wurden bisher nur zwei Stöchiometrien für Kupfer mit Histidin beschrieben, 1:1- bzw. 1:2-Komplexe, wobei im untersuchten pH-Bereich hauptsächlich der 1:2-Komplex erwartet wird [118, 125-127, 163]. Die Identifizierung wurde dabei mit Hilfe von Röntgen, Infrarot, Raman bzw. EPR (Elektronen-Paramagnetische Resonanzspektroskopie) durchgeführt. Es konnten für beide Stöchiometrien verschiedene Ladungszustände identifiziert werden.

Da die Stabilität der Kupfer-Histidin-Spezies geringer ist als die der Eisen-Citrat-Spezies, wurde mit einem 1:5-Verhältnis sichergestellt, dass die Spezies sich bilden können. So wurden sechs verschiedene Spezies identifiziert, die im Gegensatz zu den Eisen-Citrat-Spezies nicht in unterschiedlichen Ladungszuständen, sondern alle einfach negativ geladen vorlagen. Mit einem m/z von 370,1 wurde ein Komplex mit

einer 1:2-Stöchiometrie ($[\text{Cu His}_2]^-$) identifiziert. Die gleiche Stöchiometrie wurde auch in Form des Komplexes mit einem Acetataddukt mit $m/z = 430,1$ ($[\text{Cu His}_2 \text{Ac}]^-$) gefunden. Das Acetat entstammte dem für das Laufmittel verwendeten Acetatpuffer. Diese zwei Signale waren zusammen mit dem Signal bei $m/z=741,1$, das einer 2:4-Stöchiometrie ($[\text{Cu}_2 \text{His}_4]^-$) entspricht, die intensivsten Signale im gemessenen Massenbereich.

Eine Übersicht über die gemessenen Spezies bietet Tabelle 9, das Chromatogramm der Direktinfusion ist in Abbildung 39 gezeigt.

Tabelle 9: Spezies in einer Kupfer-Histidin-Mischung im Verhältnis 1:5, gemessen durch Direktinfusion bei pH 5,5

Spezies	Formel	m/z (theoretisch)	m/z (gemessen)
$[\text{His}]^-$	$\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2^-$	154,1	154,1
$[\text{His}_2]^-$	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_4^-$	309,1	309,1
$[\text{Cu His}_2]^-$	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_4\text{Cu}^-$	370,0	370,1
$[\text{Cu His}_2 \text{Ac}]^-$	$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_6\text{Cu}^-$	430,1	430,1
$[\text{Cu His}_3]^-$	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_9\text{O}_6\text{Cu}^-$	525,1	525,1
$[\text{Cu}_3 \text{His}_3]^-$	$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_9\text{O}_6\text{Cu}_3^-$	646,9	646,9
$[\text{Cu}_2 \text{His}_4]^-$	$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_{12}\text{O}_8\text{Cu}_2^-$	741,1	741,1
$[\text{Cu}_3 \text{His}_5]^-$	$\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_{15}\text{O}_{10}\text{Cu}_3^-$	959,1	959,1

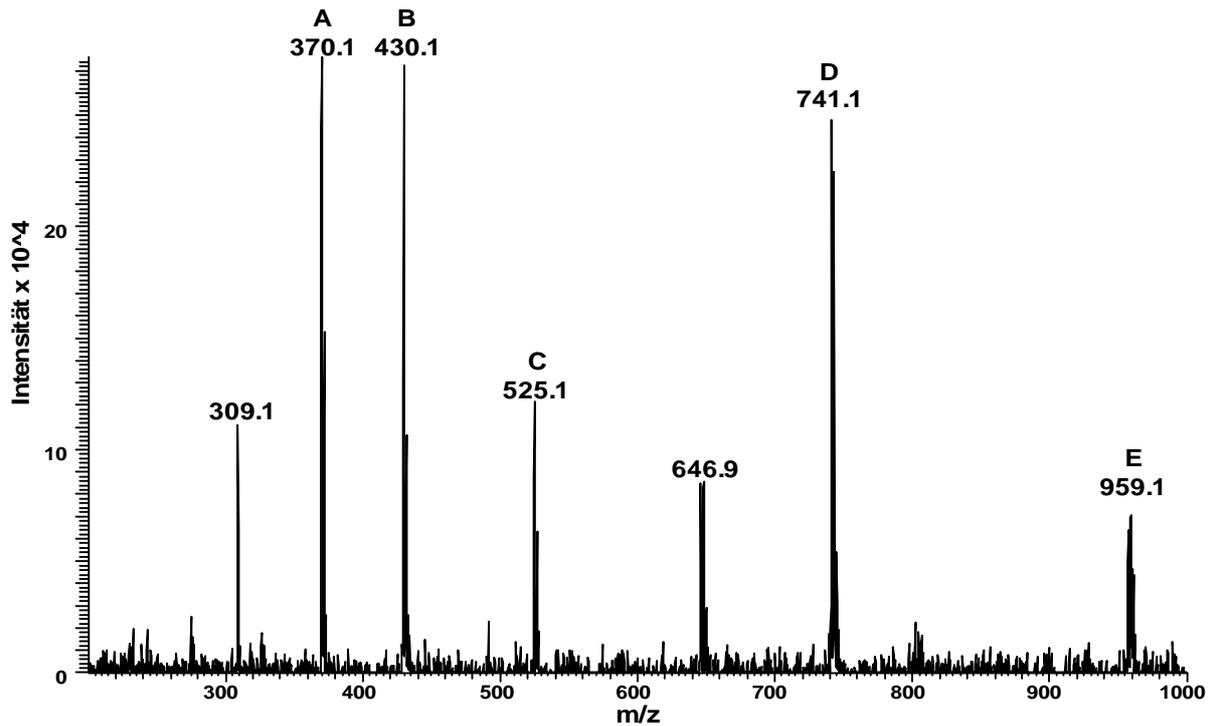


Abbildung 39: Direktinfusion einer Kupfer-Histidin-Mischung mit 1mM Kupfer und 5mM Histidin mit einem pH Wert von 5,5 (Zuordnung in Tabelle 9)

Analog zur Identifizierung der Eisen-Citrat-Spezies wurden die Isotopenmuster der Kupfer-Histidin-Spezies zur eindeutigen Identifizierung herangezogen. Die für Kupfer-Komplexe typische Isotopenverteilung war für alle Spezies deutlich zu erkennen und die Isotopenmuster stimmten sehr gut mit den simulierten Mustern überein (s. Abbildung 40).

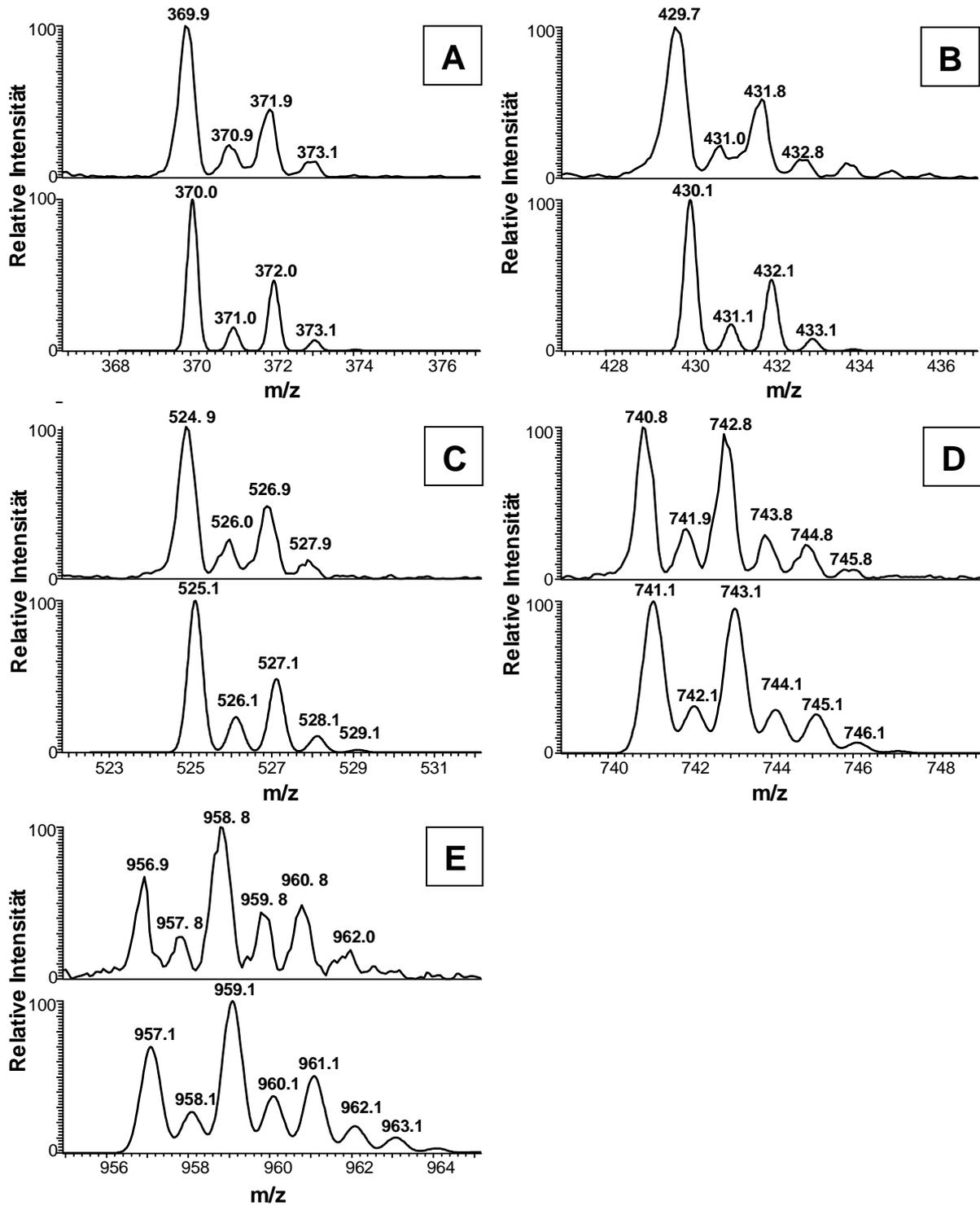


Abbildung 40: Isotopenmuster von Kupfer-Histidin-Spezies, oben: gemessenes Muster, unten: mit Xcalibur simuliertes Muster; A) $[Cu\ His_2]$ $m/z=370,0$; B) $[Cu\ His_2\ Ac]$ $m/z=430,1$; C) $[Cu\ His_3]$ $m/z=525,1$; D) $[Cu_2\ His_4]$ $m/z=741,1$; E) $[Cu_3\ His_5]$ $m/z=959,1$

MS²-Fragmentierung von Kupfer-Histidin-Spezies

Die Fragmentierung der Kupfer-Histidin-Spezies ist weit weniger komplex als die der Eisen-Citrat-Spezies. Die [Cu His₂]⁻-Spezies mit $m/z = 370,0$ zeigt im MS²-Experiment zwei Fragmente. Das Fragment mit $m/z = 326,1$ entsteht durch die Abspaltung eines Moleküls CO₂ (Massendifferenz 44), das Fragment mit $m/z = 282,1$ durch die Abspaltung von zwei CO₂-Molekülen (Abbildung 41).

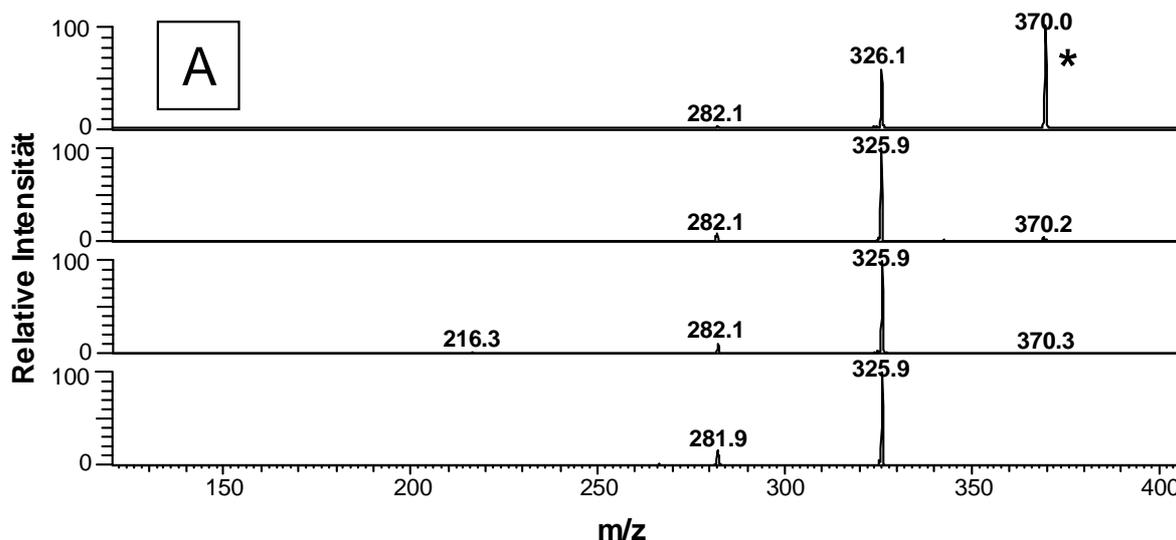


Abbildung 41: MS² von Kupfer-Histidin-Spezies (* = Parention) A) [Cu His₂]⁻ $m/z=370,0$; Fragmentierung mit steigender Kollisionsenergie (10, 20, 30, 40 % normierter Kollisionsenergie, von oben nach unten)

Die Spezies mit der Stöchiometrie [Cu His₂ Ac]⁻ mit $m/z = 430,1$ ist in den MS²-Experimenten weitestgehend stabil. Das einzige, nur bei hohen Kollisionsenergien auftretende Fragment repräsentiert die Abspaltung des Essigsäuremoleküls und zweier Moleküle CO₂, analog zur Fragmentierung der [Cu His₂]⁻-Spezies (Abbildung 42). Daher müssen bei späteren Trennungen Acetataddukte als mögliche auftretende Spezies mit berücksichtigt werden.

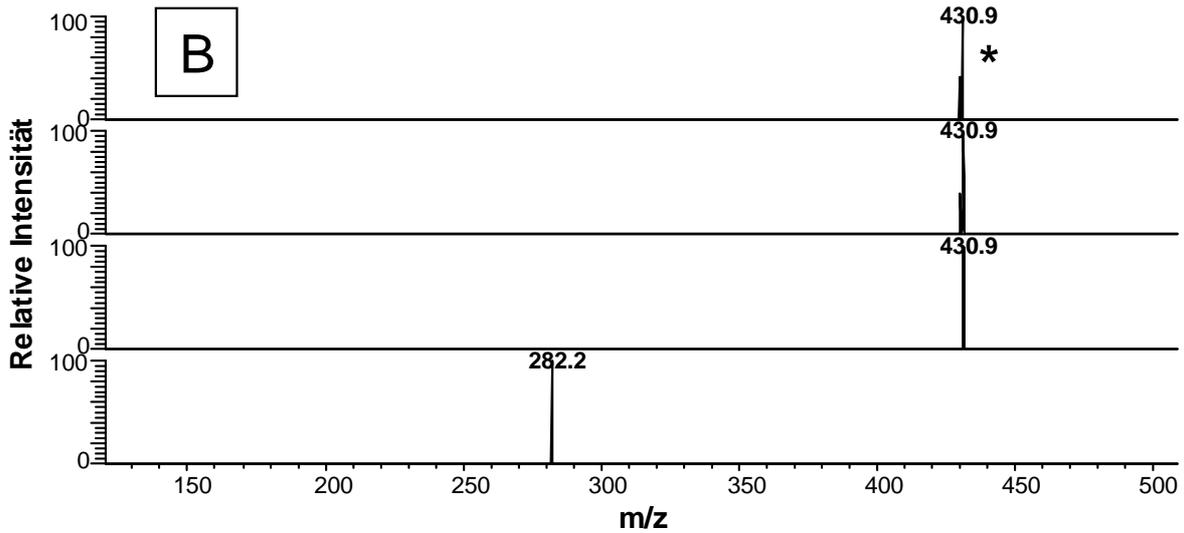


Abbildung 42: MS^2 von Kupfer-Histidin-Spezies (* = Parention) B) $[Cu His_2 Ac]$ $m/z=430,1$; Fragmentierung mit steigender Kollisionsenergie (10, 20, 30, 40 % normierter Kollisionsenergie, von oben nach unten)

Die $[Cu His_3]^-$ -Spezies mit $m/z=525,1$ zeigt schon bei geringen Kollisionsenergien mehr Fragmentierungen als die 1:2-Komplexe, ist jedoch auch bei hohen Kollisionsenergien noch in geringen Intensitäten vorhanden. Bereits bei 10 % Kollisionsenergie wird ein Molekül Histidin abgespalten, und es entsteht der weitgehend stabile 1:2-Komplex ($[Cu His_2]^-$ mit $m/z=370,0$) (Abbildung 43).

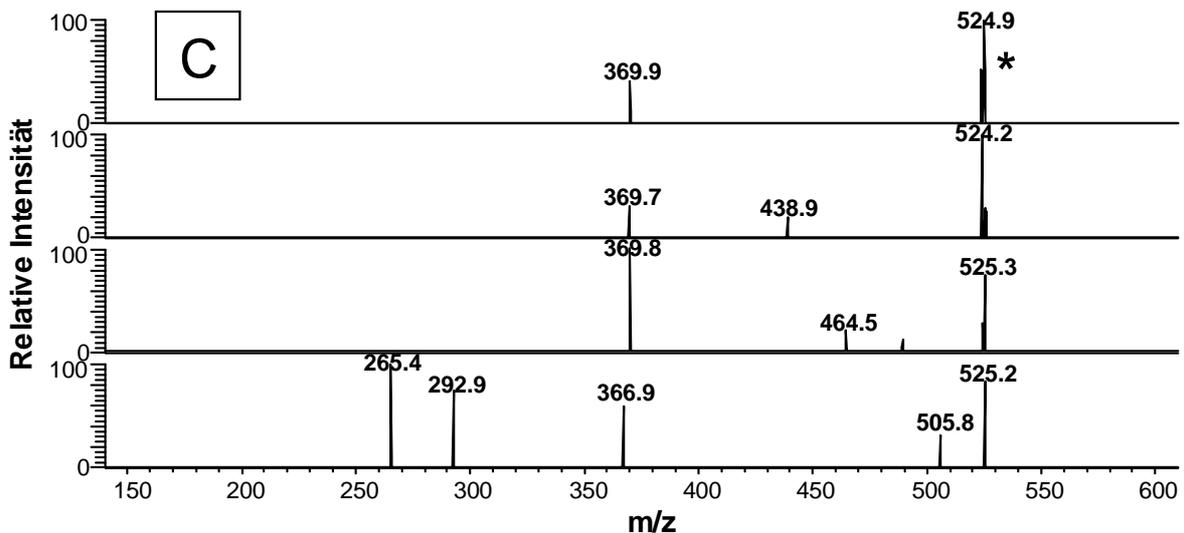


Abbildung 43: MS^2 von Kupfer-Histidin-Spezies (* = Parention) C) $[Cu His_3]$ $m/z=525,1$; Fragmentierung mit steigender Kollisionsenergie (10, 20, 30, 40 % normierter Kollisionsenergie, von oben nach unten)

Die $[\text{Cu}_2 \text{His}_4]^-$ -Spezies ($m/z = 741,1$) zeigten ebenfalls eine stärkere Fragmentierung als die 1:2-Spezies. Es wurden Abspaltungen von einem bzw. zwei Molekülen Histidin gemessen, woraus die Fragmente $m/z = 585,9$ (2:3-Spezies) und $m/z = 432,7$ (2:2-Spezies) entstanden. Auch die weitere Abspaltung von CO_2 ausgehend vom $m/z = 585,9$ Fragment wurde detektiert (Abbildung 44).

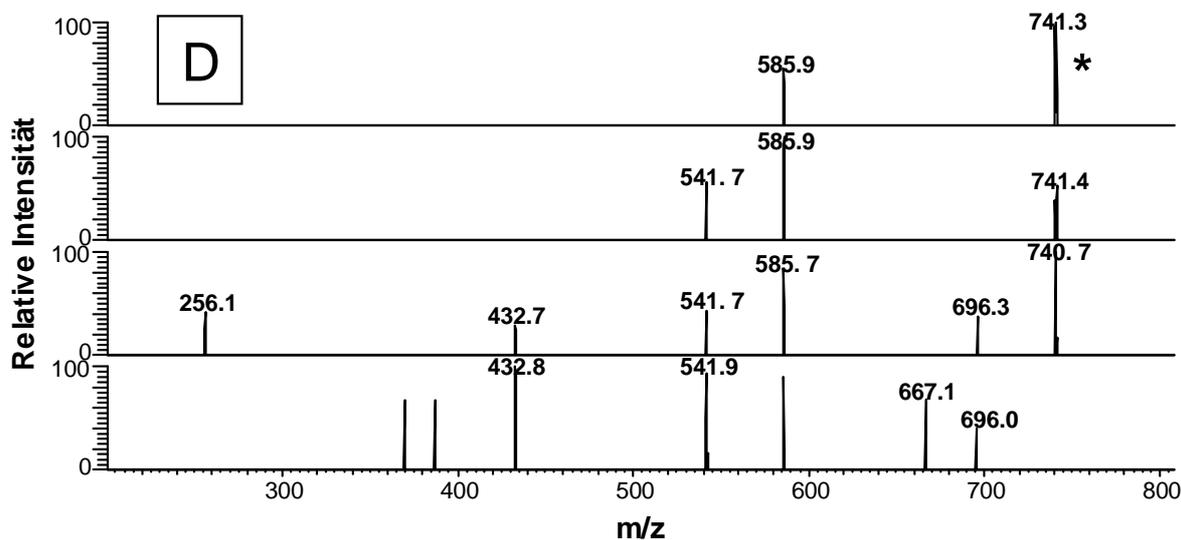


Abbildung 44: MS^2 von Kupfer-Histidin-Spezies (* = Parention) D) $[\text{Cu}_2 \text{His}_4]^-$ $m/z=741,1$; Fragmentierung mit steigender Kollisionsenergie (10, 20, 30, 40 % normierter Kollisionsenergie, von oben nach unten)

Es wurde gezeigt, dass die aus der Literatur bekannte 1:2-Spezies unter den gegebenen Kollisionsbedingungen sehr stabil ist. Größere Komplexe fragmentierten unter der Abspaltung von Histidin.

In diesem Kapitel wurden die Spezieszusammensetzungen der Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Modellmischungen untersucht. In der Eisen-Citrat-Mischung wurden vier verschiedene Stöchiometrien in verschiedenen Ladungszuständen detektiert (Tabelle 8). In der Kupfer-Histidin-Mischung wurden fünf verschiedene Stöchiometrien und ein Acetataddukt gemessen, die alle einfach negativ geladen waren.

Die MS^2 -Untersuchungen der intensivsten Komplexsignale brachten Hinweise auf unterschiedliche Fragmentierungs-Stabilitäten der einzelnen Spezies. So konnten beispielsweise für die $[\text{Fe}_3 \text{Cit}_3]^{2-}$ -Spezies lediglich CO_2 -Abspaltungen und somit eine gute Stabilität gezeigt werden, für die einfach negativ geladene Spezies wurde stärkere Fragmentierung gemessen. Die $[\text{Fe}_3 \text{Cit}_4]$ und $[\text{Fe}_3 \text{Cit}_4]^{2-}$ -Spezies zeigten

schon bei geringer Kollisionsenergie eine starke Fragmentierung in die 1:2- und 2:2-Spezies bzw. in die 3:3-Spezies und somit eine wesentlich geringere Stabilität als die 3:3-Spezies.

Die [Cu His₂]-Spezies zeigte bei den Fragmentierungsexperimenten ausschließlich CO₂-Abspaltungen, was für eine relativ große Stabilität der Spezies spricht. Größere Komplexe, wie z.B. [Cu₂ His₄], verloren bereits bei geringer Kollisionsenergie Histidin und waren somit instabiler.

Diese Ergebnisse ermöglichen Aussagen über die Stabilität der Komplexe bei der Detektion mit MS, die für die Beurteilung von nach der Trennung gemessenen Komplexen von Bedeutung sind.

6.2.4 Trennung von labilen Metallkomplexen in Modellmischungen

Mit der Identifizierung der Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Spezies (Kapitel 6.2.3) war die Voraussetzung gegeben, die Trennbarkeit und das Trennverhalten der Spezies zu untersuchen. Die Auswahl geeigneter stationärer Phasen wurde bereits anhand von ausgewählten Metabolitstandards getroffen (Kapitel 6.2.2). Auf dieser Basis sollte erstmals ein Trennverfahren für diese labilen Spezies entwickelt werden. Folgende Punkte müssen dabei geklärt werden.

- I) Stabilität der Spezies während der Trennung
- II) Trennbarkeit der Spezies voneinander und vom freien Liganden
- III) Trennverhalten auf den ausgewählten Säulenmaterialien

Die Trennbarkeit wurde in Modellsystemen ohne Matrixeinfluss untersucht. Bisher wurden nur wenige Beispiele für HILIC-Trennungen für andere (stabileren) Metallspezies in Pflanzen berichtet. Ouerdane et al. [95] trennten einen 1:2 Ni-Malat-Komplex, Ni-Citrat-Komplexe (1:2 und 2:2) sowie Ni-Histidin (1:1 und 1:2) nach SEC-Fraktionierung in Extrakt von *Thlaspi caerulescens*. Die Trennung zahlreicher Phytosiderophor- und NA-Metall-Komplexe (DMA: Fe³⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺; NA: Fe²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) wurde von Xuan et al. in Weizen (*Triticum aestivum*, cv. *Bezostaya*) durchgeführt [37]. Weber et al. [69] trennten ebenfalls NA- und Phytosiderophor-Komplexe (Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) aus Weizen (*Triticum*) und Nickel-Spezies (Asp 1:2, Malat 1:2, Citrat 1:1, 1:2) aus Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*).

Trennung von Eisen-Citrat-Spezies in Modellmischungen

Die Untersuchung des Trennverhaltens der Eisen-Citrat-Spezies erfolgte auf der Diolphase (Luna HILIC), der Amidphase (Amide-80) und der zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic-HILIC). Auf allen drei Säulen wurden die Komplexe in zwei Gruppen getrennt (Abbildung 45). Das freie Citrat eluierte auf allen Säulen deutlich vor den Komplexen (nicht abgebildet). Die stärkste Retention (26,7 min, 29,6 min) und gleichzeitig die größte Auftrennung ($R_{\text{Zwitterionisch}} = 2,97$;) der zwei Gruppen wurden auf der zwitterionischen Säule gemessen, die schwächste Retention auf der Diolphase (18,5 min, 20,0 min; $R_{\text{Diol}} = 1,6$). Die Retention auf der Amidphase ist fast so stark wie die auf der zwitterionischen Phase (26,0 min, 26,5 min; $R_{\text{Amid}} = 1,5$), die Auflösung der beiden Gruppen ist mit $R = 1,5$ bzw. $R = 1,6$ jedoch wesentlich schlechter.

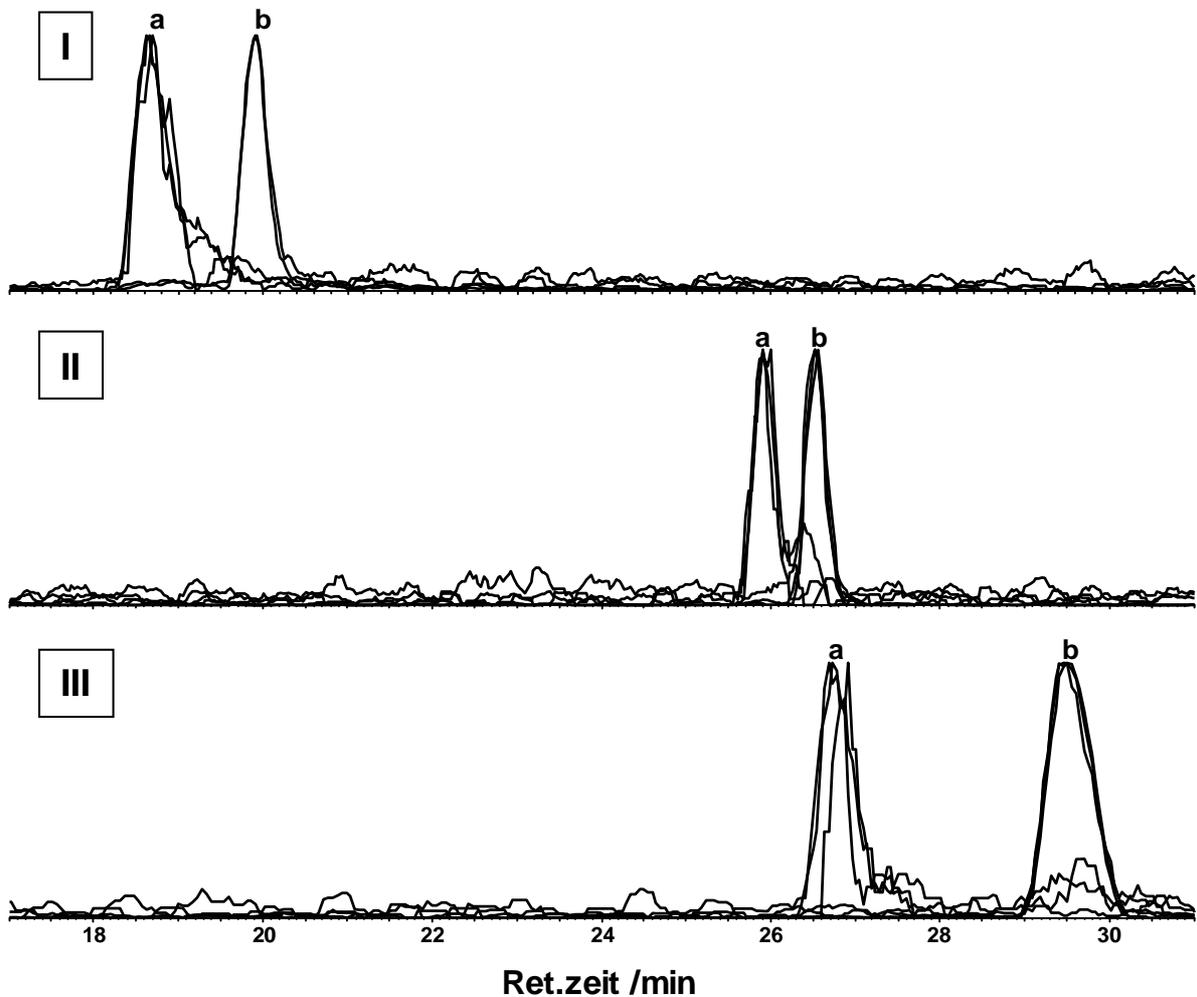


Abbildung 45: Trennung I: Trennung von Eisen-Citrat-Spezies auf drei verschiedenen HILIC-Phasen, I) Diolphase (Luna HILIC), II) Amidphase (Amide-80), III) zwitterionische Sulfobetainphase (Zic HILIC); Signal a) 3:3-Stöchiometrie; b) 1:2- und 3:4-Stöchiometrie

Die zwei getrennten Gruppen bestanden jeweils aus mehreren Spezies. Das jeweils erste Signal a) bestand aus den einzelnen Spezies $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3]^{2-}$, $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3 \text{ H}_2\text{O}]^{2-}$ und $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3]^-$, also den Spezies mit 3:3-Stöchiometrie. Das zweite Signal b) bestand aus den Spezies $[\text{Fe} \text{ Cit}_2]^-$, $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_4]^{2-}$ und $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_4]^-$, also den 1:2- und 3:4-Stöchiometrien, wobei bei den Messungen teilweise auch geringe Intensitäten der 2:2-Spezies zu beobachten waren, die aufgrund geringer Intensitäten und eines schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht bei allen Messungen eindeutig zu erfassen waren.

Dieses Trennverhalten lässt vermuten, dass die detektierten 1:2- und 2:2-Spezies Artefakte des 3:4-Komplexes sind. Auf allen Säulen wurden die gleichen Spezies voneinander getrennt eluiert, die 1:2-, 2:2- und 3:4-Spezies eluierten immer gemeinsam. Da die Säulenmaterialien unter den hier verwendeten Trennbedingungen sowohl für die Metaboliten als auch für den Fe(III)-EDTA-Komplex (s. Kapitel 6.2.2) ein sehr unterschiedliches Trennverhalten zeigten (für die Trennung des EDTA-Komplexes vom freien Liganden sogar unterschiedliche Retentionsreihenfolgen), erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass drei unterschiedliche Spezies (1:2, 2:2, 3:4) auf allen drei Säulen koeluierten. Die bei der Fragmentierung festgestellte geringe Stabilität des 3:4-Komplexes und das Fragmentierungsmuster in 1:2 und 2:2 passt zu dieser Annahme. Die bei den Fragmentierungsversuchen aufgetretenen 3:3-Fragmente waren in der Trennung nicht zu beobachten.

Die Reihenfolge der Retention ist auf allen Säulen gleich: zuerst eluiert das freie Citrat, dann der 3:3-Komplex und zuletzt der 3:4-Komplex. Vermutlich ist diese Reihenfolge auf die Größe der Hydrathülle zurückzuführen, die für die Komplexe mit dem zentralen Metallkation die für das freie Citrat übertreffen sollte. Im Vergleich der Komplexe ist die Hydrathülle des 3:4-Komplexes durch das zusätzliche Citrat und die damit verbundenen negativen Partialladungen größer als die des 3:3-Komplexes. Da mit zunehmender Hydrathülle die Retention durch die immobilisierte Wasserschicht stärker ist, ist die beobachtete Retentionsreihenfolge sinnvoll. Die tatsächlichen Ladungszustände der Komplexe während der Trennung sind durch die ESI-MS-Detektion nicht genau zu bestimmen, da bei der Ionisierung der Ladungszustand geändert werden kann.

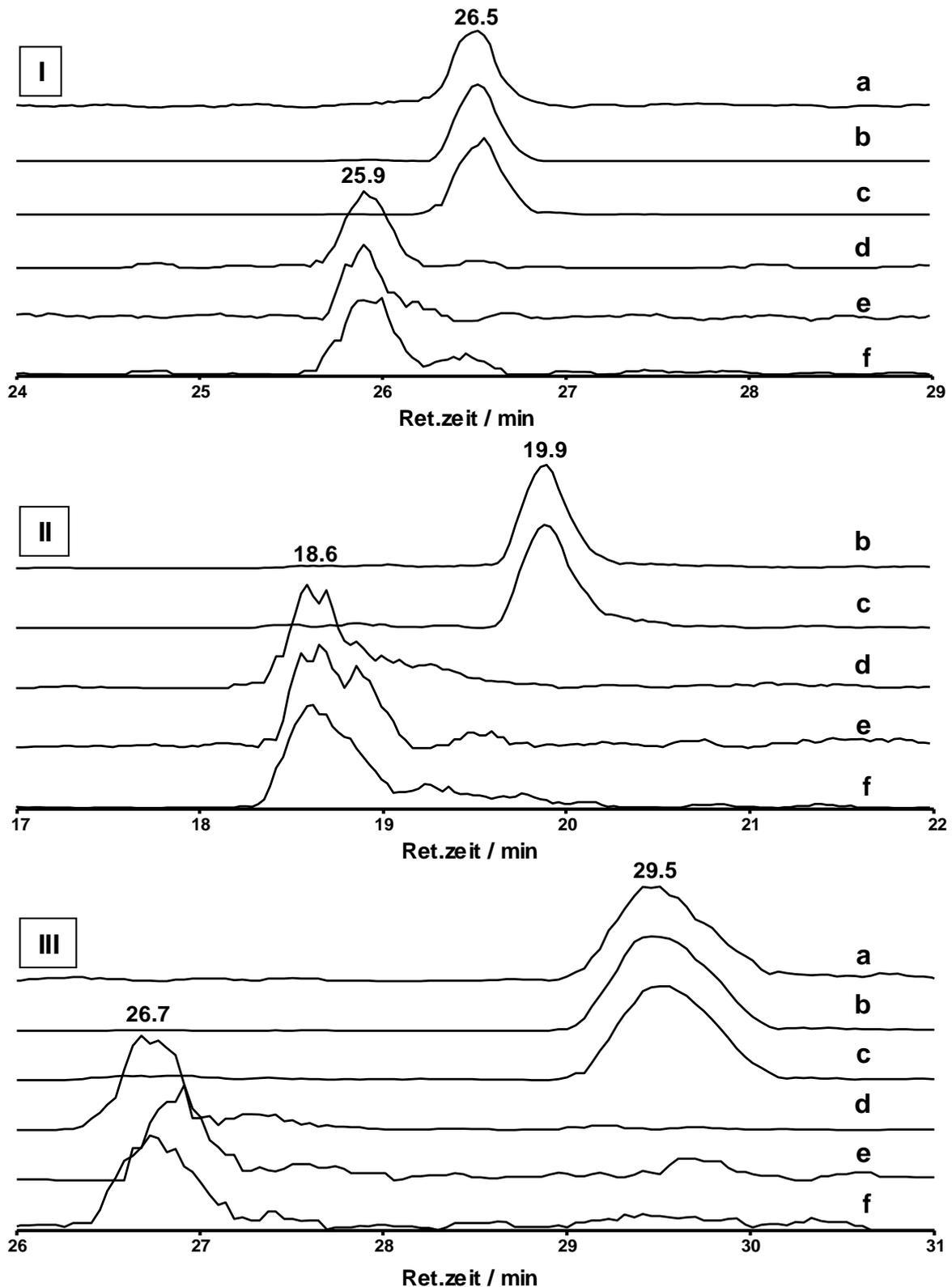


Abbildung 46: Trennung von Eisen-Citrat-Spezies auf einer I) Amidphase (Amide-80) II) Diolphase (Luna HILIC) und III) zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC); exakte Zusammensetzung der zwei resultierenden Signale; gezeigte Spezies sind a) $[\text{Fe Cit}_2]$, b) $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_4]^{2-}$, c) $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_4]$, d) $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3]^{2-}$, e) $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3 \text{ H}_2\text{O}]^{2-}$, f) $[\text{Fe}_3 \text{ Cit}_3]$; die Chromatogramme wurden mit der Xcalibur-Software geglättet (5pt)

Parallel zu den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit gelang es Rellan-Alvarez et al. Erstmals, zwei Eisen-Citrat-Spezies chromatographisch auf einer zwitterionischen HILIC-Säule voneinander zu trennen [25]. In einer Modelllösung wurde ein 2:2-Eisen-Citrat-Komplex von einem 3:3-Komplex getrennt. Von den zwei Komplexen wurde nur die 3:3-Spezies in Pflanzenproben (Tomaten-Xylemsaft) gefunden.

Die von Rellan-Alvarez gefundene 3:3-Spezies entspricht der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls identifizierten Spezies. Die 2:2-Spezies wurde dagegen in dieser Arbeit in einem Signal mit der 3:4- und 1:2-Spezies gefunden. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der 2:2-Spezies in der vorliegenden Arbeit um ein Artefakt aus der Fragmentierung der 3:4-Spezies handelt. Rellan-Alvarez verwendeten in ihrer Arbeit einen Methanol-Gradienten, während die Trennung in dieser Arbeit mit einem Acetonitril-Gradienten durchgeführt wurde. Die Verwendung unterschiedlicher organischer Komponenten beeinflusst die Lage der Speziesgleichgewichte von Eisen-Citrat [27]. Daher ist es möglich, dass in Gleichgewichten in Methanolgemischen eine der Hauptspezies die 2:2-Spezies ist, während in Acetonitril die 3:4-Spezies eine Hauptkomponente darstellt. Die Retentionsreihenfolge Citrat<2:2<3:3 ist logisch, sofern die Größe der Hydrathülle maßgeblich ist für die Retention durch Verteilung in die immobilisierte Wasserschicht (s.o.). Das freie Citrat besitzt eine wesentlich kleinere Hydrathülle als die größeren Komplexe, die durch das zentrale Eisen mehr positive und negative partielle Ladungen besitzen, die die Ausbildung einer Hydrathülle begünstigen. Die kleinere 2:2-Spezies besitzt demnach eine geringere Hydrathülle und eluiert vor der 3:3-Spezies. Die Verwendung von Methanol verändert das Retentionsverhalten im Vergleich zu Acetonitril dahingehend, dass das polarere Methanol ein stärkerer Eluent ist und damit die Retentionszeiten verkürzt [153]. Den gleichen Effekt bewirkt die Erhöhung der Säulentemperatur, die entsprechend der van't-Hoff-Gleichung zur Verringerung der Retention führt [148].

Bei der Trennung von Eisen-Citrat-Spezies in Xylemsaft von Tomaten fanden Rellan-Alvarez et al. nur die 3:3-Spezies. In der vorliegenden Arbeit wurde in Weizenextrakt ebenfalls nur eines der zwei Signale gefunden. Im Gegensatz zur Literatur handelte es sich dabei um die 3:4-Spezies. Die 3:3-Spezies wurde nicht gefunden. Silva et al. zeigten, dass die 3:3-Spezies bevorzugt bei sehr geringem Citratüberschuss vorliegt [26]. Das stimmt mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen überein (Abbildung

37) und wurde auch von Rellan-Alvarez so bestätigt [25]. Eine schlüssige Erklärung für die unterschiedlichen Spezies in Tomate und Gerste ist das unterschiedliche Citrat-Eisen-Verhältnis. Ein großer Überschuss in der Gerste begünstigt die Bildung der 3:4-Spezies (eigene Arbeit), während ein geringerer Citrat-Überschuss in Tomate zur Bildung der 3:3-Spezies führt.

Somit lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Rellan-Alvarez et al. [25] unter Berücksichtigung der verwendeten Trennbedingungen und der verschiedenen Bedingungen in den untersuchten Pflanzen in Einklang bringen.

Trennung der Eisen-Citrat-Komplexe mit CE

Die Eisen-Citrat-Spezies wurden mit Kapillarelektrophorese (CE) als komplementäre Trenntechnik getrennt. Damit sollte festgestellt werden, ob es sich um zwei oder mehrere, in der HILIC-Trennung koeluiierende Spezies handelt [167]. Im Unterschied zur HILIC-Chromatographie, bei der die Trennung aufgrund von Verteilung und Wechselwirkungen mit der stationären Phase erfolgt, werden bei der CE die Analyten in einem elektrischen Feld getrennt. Die Eisen-Citrat-Spezies wurden bei der HILIC-Trennung in zwei Signale getrennt. Während das erste Signal nur die 3:3-Spezies enthält, enthält das zweite Signal die Spezies mit 1:2-, 2:2- und 3:4-Stöchiometrie. Die Koelution dreier so verschiedener Komplexe ist sehr unwahrscheinlich. In den MS²-Experimenten wurde für die 3:4-Spezies die Fragmentierung in 1:2- und 2:2-Fragmente gemessen. Die logische Schlussfolgerung ist, dass die 1:2- und 2:2-Spezies Artefakte aus der Fragmentierung der 3:4-Spezies sind. Eine der zentralen Forderungen der biologischen Fragestellung, der definierte pH-Wert, ist bei der CE-Analyse ebenfalls erfüllt. Von Vorteil ist dabei, dass die Trennungen nicht in Lösungsmittelgemischen, sondern in rein wässrigen Systemen durchgeführt werden. So ist der pH-Wert eindeutig bestimmbar, während die pH-Bestimmung in Gemischen mit organischen Lösungsmitteln nur näherungsweise möglich ist. Zudem werden für die CE-Trennung völlig andere Puffersysteme verwendet als in der HPLC-MS. Das ist von Bedeutung, da fast alle Puffer potentielle Liganden für Metalle sind. Da die Puffer in sehr viel höheren Konzentrationen vorkommen als die Analyten, besteht die Möglichkeit, dass sie die bestehenden Gleichgewichte der Metallspezies beeinflussen und z. B. gegen Liganden ausgetauscht werden.

Ein weiteres wichtiges Merkmal der CE besteht in der Verwendung einer Kapillare.

Die freien Silanolgruppen der Quarzkapillare sind bei neutralem pH-Wert vollständig dissoziiert, so dass die Oberfläche vollständig negativ geladen ist. Damit kommt es zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht, die im elektrischen Feld wandert und so zur Ausbildung eines EOF führt. Auf diese Weise wandert die gesamte Flüssigkeitssäule im elektrischen Feld, so dass auch Anionen wie z. B. Citrat auf der Kathodenseite detektiert werden können. Darüber hinaus werden die Silanolgruppen durch die Doppelschicht abgeschirmt und die Wechselwirkungen mit den Analyten werden minimiert.

Die Messungen wurden mit einem kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor C⁴D und einem UV-Detektor detektiert (s. Kapitel 4.1.2, 0). Im Gegensatz zur ESI-MS-Detektion bei der HILIC-Trennung, die notwendigerweise ein Interface benötigt, werden die Analyten durch die Detektion nicht beeinflusst, da beide Detektoren *on column* durch die Kapillarenwand messen. Die Ladungszustände der Analyten bleiben unverändert und Artefaktbildungen, wie z. B. Fragmentierungen, werden verhindert. Da die Messstrecke für die UV-Detektion dem Durchmesser der Trennkapillare entspricht und damit im Vergleich zu sonst üblichen Z-Zellen gering ist, ist die Empfindlichkeit der Detektion begrenzt. Auch waren die Eigenschaften der Eisen-Citrat-Komplexe bezüglich der Detektionsarten bisher unbekannt. Daher wurde ergänzend die C⁴D-Detektion verwendet. Um die Vergleichbarkeit der CE-Messungen zu ermöglichen, werden bei der Darstellung der Trennungen auf der x-Achse die Trennzeiten in Mobilitäten umgerechnet.

Um das Trennverhalten von Eisen-Citrat in der CE zu bestimmen, wurde eine den HPLC-Messungen entsprechende Eisen-Citrat-Modellmischung (mit Citratüberschuss) und freies Citrat gemessen. Dabei wurden für die Eisen-Citrate zwei eindeutig getrennte Signale mit einer Mobilität von $-3,3 \cdot 10^{-4}$ und $-3,75 \cdot 10^{-4} \mu\text{e}/\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ gemessen, die wiederum vom reinen Citrat gut getrennt waren, das eine deutlich negativere Mobilität ($-4,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{e}/\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) zeigte (Abbildung 47). Somit handelt es sich um negativ geladene Komplexe, die jedoch eine weniger stark negative Mobilität besitzen als das Citrat. Die Eisen-Citrat-Komplexe sind wesentlich größer als ein freies Citrat-Molekül, insbesondere durch die Ausbildung einer Hydrathülle. Daraus resultiert die weniger negative Mobilität der Komplexe im Vergleich zum freien Citrat, auch bei gleicher Anzahl negativer Ladungen. Demnach ist anzunehmen, dass es sich bei Signal a (geringste negative Mobilität) um den 3:4-Komplex handelt, der aufgrund seiner Größe eine geringere negative Mobilität haben

sollte als der 3:3-Komplex (Signal b).

Die Ergebnisse der CE-Trennung bekräftigten die Aussagen, die aus den HPLC-Ergebnissen abgeleitet wurden. In der HPLC wurden zwei Signale voneinander getrennt, von denen in einem Signal neben der 3:4-Spezies auch 1:2- und 2:2-Spezies detektiert wurden. Diese beiden Spezies wurden nach weiteren Untersuchungen als Fragmente der 3:4-Spezies interpretiert. In der CE-Trennung wurden ebenfalls zwei Signale für die Eisen-Citrat-Spezies detektiert. Das unterstützt die oben genannte Interpretation von zwei Hauptspezies. Die Koelution der drei unterschiedlichen Eisen-Citrat-Spezies in zwei komplementären Trennverfahren ist extrem unwahrscheinlich.

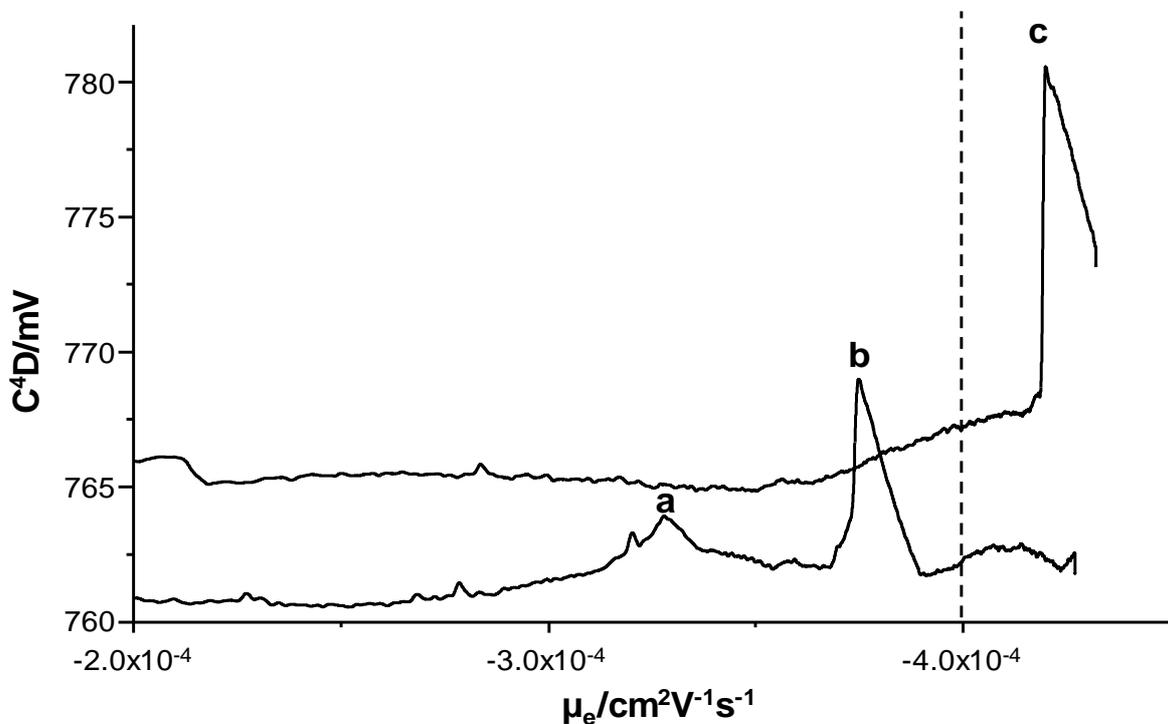


Abbildung 47: Trennverhalten von Eisen-Citrat (a, b) und freiem Citrat (c) (Eisen 100 $\mu\text{mol/l}$, Citrat 10 mmol/l) in der Trennung mit CE und Detektion mit C^4D , MES/TRIS (20/20 mM) pH 7,3

Für die Detektion in der CE wurden zwei verschiedene Detektoren eingesetzt, ein UV-Detektor und ein C^4D . In Abbildung 48 wurde die Übereinstimmung der mit beiden Detektoren erzielten Messergebnisse gezeigt. Sowohl der UV- als auch der Leitfähigkeitsdetektor zeigen im Bereich der Eisen-Citrat-Komplexen die gleichen zwei Signale, da die Komplexe stark geladen und in hohen Konzentrationen in den

Modellösungen enthalten sind.

Eine Besonderheit ist in der UV-Detektion messbar. Im Mobilitätsbereich zwischen $-2,4 \cdot 10^{-4}$ und $-2,0 \cdot 10^{-4}$ (s. Abbildung 48, unten) wurde eine Gruppe von drei Signalen detektiert, die in der C^4D -Detektion nur angedeutet sichtbar waren. Insgesamt entsprechen die Signale aber nur ca. 10% der gesamten Signalintensität. Es ist denkbar, dass es sich dabei um Komplexe mit zweiwertigem Eisen handelt. Die gemessene Mobilität weist entweder auf eine geringere negative Ladung hin oder darauf, dass die Komplexe bei ähnlicher Ladung effektiv größer sind als die Komplexe mit dreiwertigem Eisen. Die Leitfähigkeit dieser Fe(II)-Komplexe ist sehr gering, so dass die Signale in der C^4D nur andeutungsweise zu sehen sind. Es ist unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich, zwischen aus den Proben stammendem und aus Redoxreaktionen stammendem Fe(II) zu unterscheiden. Eine zweite Möglichkeit, die Herkunft der unbekanntenen Signale zu erklären, ist eine Reaktion der Komplexe mit dem MES/Tris-Puffer. Diese sind gut UV-aktiv und sollten daher auch bei geringen Mengen in der UV-Detektion gut messbar sein.

Wegen der fehlenden Unterscheidbarkeit der Herkunft des Fe(II), der geringen Gehalte und der geringen Stabilität von Fe(II)-Komplexen wurde die Untersuchung der Eisen-(II)-Komplexe bei der Problemstellung dieser Arbeit nicht berücksichtigt (s. Kapitel 2).

Es wurde gezeigt, dass beide Detektionsmethoden zu übereinstimmenden Ergebnissen kommen. Die Detektion von zwei Hauptspezies in zwei Signalen steht im Einklang mit den Strukturen, die in der HILIC-Trennung identifiziert wurden.

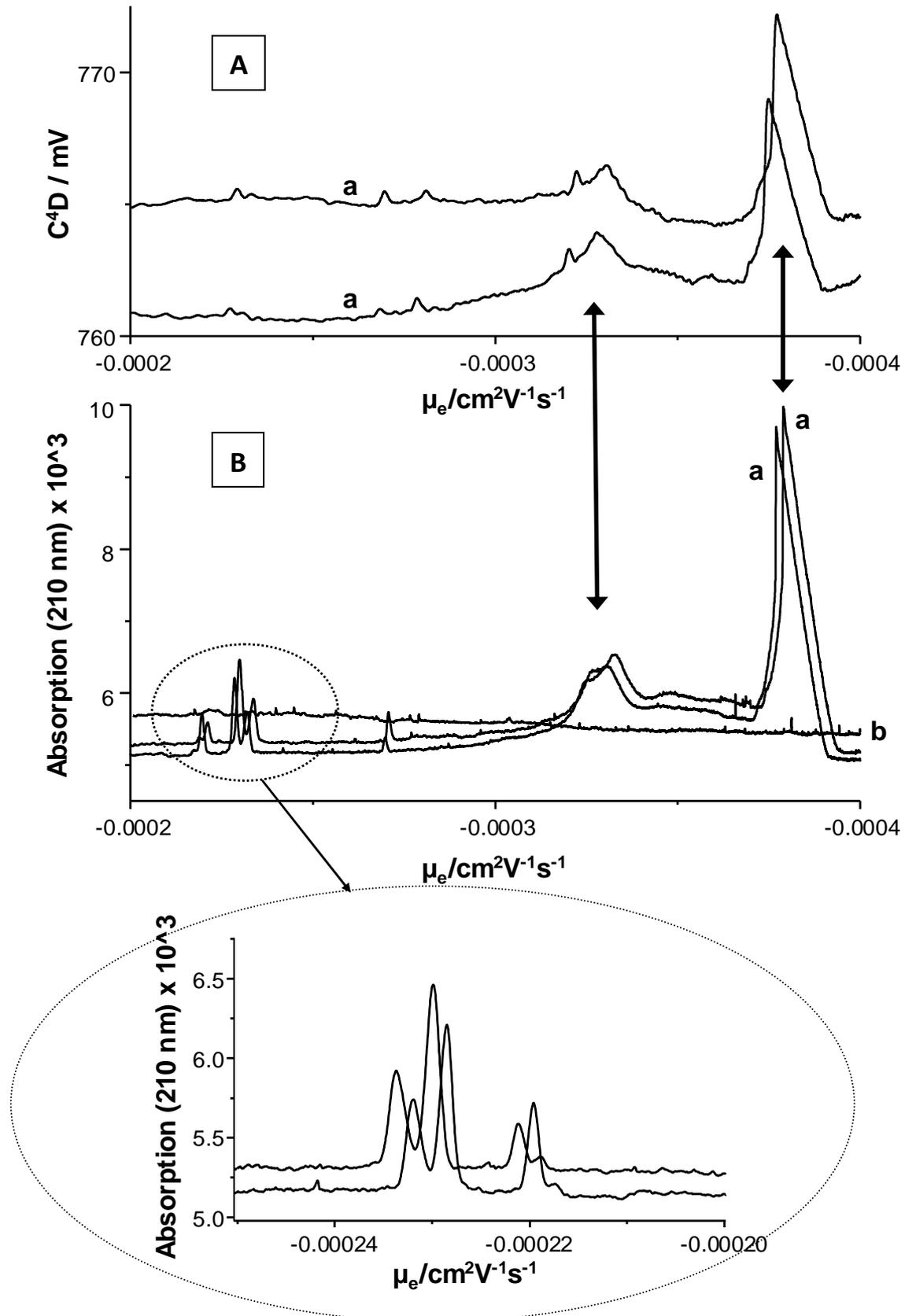


Abbildung 48: Vergleich der beiden verwendeten Detektoren A) C^4D B) UV für die CE-Trennung eines Eisen-Citrat-Standards (zwei Replikate) (a) und freien Citrates (b), MES/TRIS (20/20 mM) pH 7,3

Trennung von Kupfer-Histidin-Spezies in Modellmischungen

Neben den Eisen-Citrat-Komplexen wurden auch die bereits identifizierten Kupfer-Histidin-Spezies mit HILIC getrennt (Abbildung 49). Auch hier wurden zwei Spezies-Signale gemessen, von denen das frühere jedoch mit dem freien Histidin koeluierte.

Die Retention war auf der zwitterionischen Phase ähnlich stark wie auf der Amidphase, die Auftrennung der zwei Signale war auf der Amidphase wesentlich geringer als auf der zwitterionischen. Die Diolphase zeigte eine geringere Retention und die Trennung lag zwischen der auf der Amidphase und der auf der zwitterionischen.

Die Elutionsreihenfolge ist auf allen drei Säulen die gleiche. Zuerst wird das freie Histidin mit dem 1:3-Komplex eluiert, und im zweiten Signal eluieren alle anderen Spezies. Vom Histidin ist bekannt, dass es unter den vorliegenden Trennbedingungen als einfach positives Molekül vorliegt (Tabelle 7). Für die in der Literatur beschriebenen Komplexe (1:1- und 1:2-Stöchiometrie) wurde sowohl der einfach als auch der zweifach positive Zustand gemessen, je nach Anordnung der Liganden [124, 162]. Daher ist es naheliegend, dass die Komplexe (vor allem, falls die größeren Komplexe auf die 1:2-Stöchiometrie zurückzuführen sind) mehr positive Ladungen besitzt als der freie Ligand und daher später eluiert wird.

Alle Komplexe bis auf die 1:3-Spezies eluierten nach dem freien Histidin zusammen in einem Signal. Dieses Signal enthielt die $[\text{Cu His}_2]^+$, $[\text{Cu}_3 \text{His}_3]^+$, $[\text{Cu}_2 \text{His}_4]^+$ und $[\text{Cu}_3 \text{His}_5]^+$ -Spezies. Die Ausnahme stellte die $[\text{Cu His}_3]^+$ -Spezies dar, die mit dem freien Histidin koeluierte.

In der MS^2 -Fragmentierung erwiesen sich die größeren Komplexe im zweiten Signal als relativ instabil. Die Ausnahme war die 1:2-Spezies, die als einzige Spezies bis auf CO_2 -Abspaltungen stabil war (s. Kapitel 6.2.1). Daher werden die verschiedenen größeren Komplexe auf die Bildung aus der 1:2-Spezies im ESI während der Ionisierung zurückgeführt.

Bei der mit dem Histidin koeluiierenden 1:3-Spezies ist es denkbar, dass es sich um eine labile Spezies handelt, die durch den Histidin-Überschuss stabilisiert wird. In der Literatur wurde bisher die Existenz einer solchen 1:3-Spezies nicht beschrieben. Die Auftrennung der Kupfer-Histidin-Komplexe in zwei Signale wurde mit Hilfe von CE-Trennungen weiter untersucht.

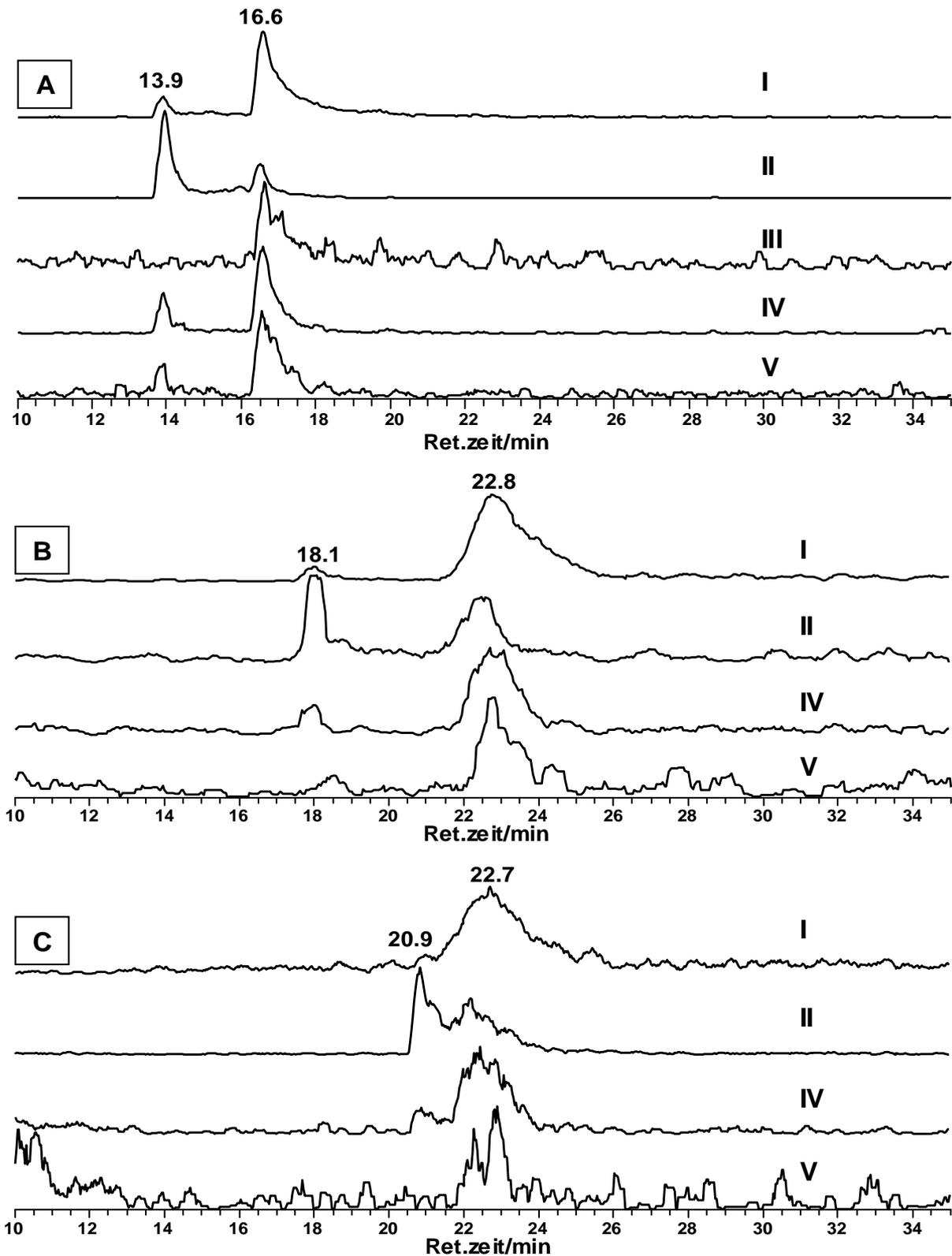


Abbildung 49: Chromatographische Trennung von Kupfer-Histidin-Spezies: I) $[\text{Cu His}_2]$; II) $[\text{Cu His}_3]$; III) $[\text{Cu}_3 \text{His}_3]$; IV) $[\text{Cu}_2 \text{His}_4]$; V) $[\text{Cu}_3 \text{His}_5]$ auf 3 verschiedenen HILIC-Phasen: A) Diolphase (Luna HILIC); B) zwitterionische Sulfobetainphase (Zic HILIC); C) Amidphase (Amide-80)

CE-Trennung von Kupfer-Histidin-Spezies

Die Kupfer-Histidin-Komplexe wurden der CE-Trennung unterzogen. Dabei wurde ein Histidinüberschuss mit ansteigenden Mengen an Kupfer versetzt (Abbildung 50). Hier werden freies Kupfer (a), freies Histidin (d) als auch zwei Komplex-Signale (b, c) mit positiven Mobilitäten gemessen. Das breite Signal b) bei einer Mobilität von $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{e}/\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ nimmt mit ansteigendem Kupfergehalt zu, wohingegen das Signal c) bei $0,25 \cdot 10^{-4} \mu\text{e}/\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ nur bei sehr geringer Kupferkonzentration detektierbar ist.

Die Detektierbarkeit zweier Komplex-Signale entspricht den Ergebnissen der HPLC-Trennung, wo ebenfalls zwei Signale gemessen wurden. Auch bei der HPLC existierte die 1:3-Spezies nur in Gegenwart eines Histidin-Überschusses, was den Schluss nahelegt, dass es sich bei Signal c) aus der CE-Messung um diese Spezies handelt, da dieses Signal auch ausschließlich mit großem Histidin-Überschuss existiert. Das Signal b), das proportional zur Kupfermenge zunimmt, deutet auf eine wesentlich stabilere Spezies hin. Da die 1:2-Spezies nach HPLC und MS-MS-Fraktionierung der stabilste Komplex zu sein scheint, ist es naheliegend, dass es sich bei Signal b) um diese Spezies handelt.

Die Detektion der Kupfer-Histidine bei positiven Mobilitäten zeigt zudem, dass es sich bei den Komplexen in Lösung um positiv geladene Komplexe handelt. Die Mobilität der Komplexe liegt zwischen der Mobilität des freien Kupfers (zweifach positiv) und der des freien Histidins (einfach positiv). Die Komplexe sind im Vergleich zum freien Histidin wesentlich größer, so dass sie bei ähnlicher Ladung eine geringere Mobilität besitzen als das Histidin. Auch die Reihenfolge der Komplexe ist über die Größe erklärbar, da der größere 1:3-Komplex eine geringere Mobilität besitzt als der kleinere 1:2-Komplex.

Wie auch bei den Eisen-Citrat-Komplexen wurden auch hier keinerlei weitere Komplexe über die Anzahl der aus der HPLC vermuteten hinaus getrennt. Damit kann eine zufällige Koelution verschiedener Komplexe auch für die Kupfer-Histidine ausgeschlossen werden.

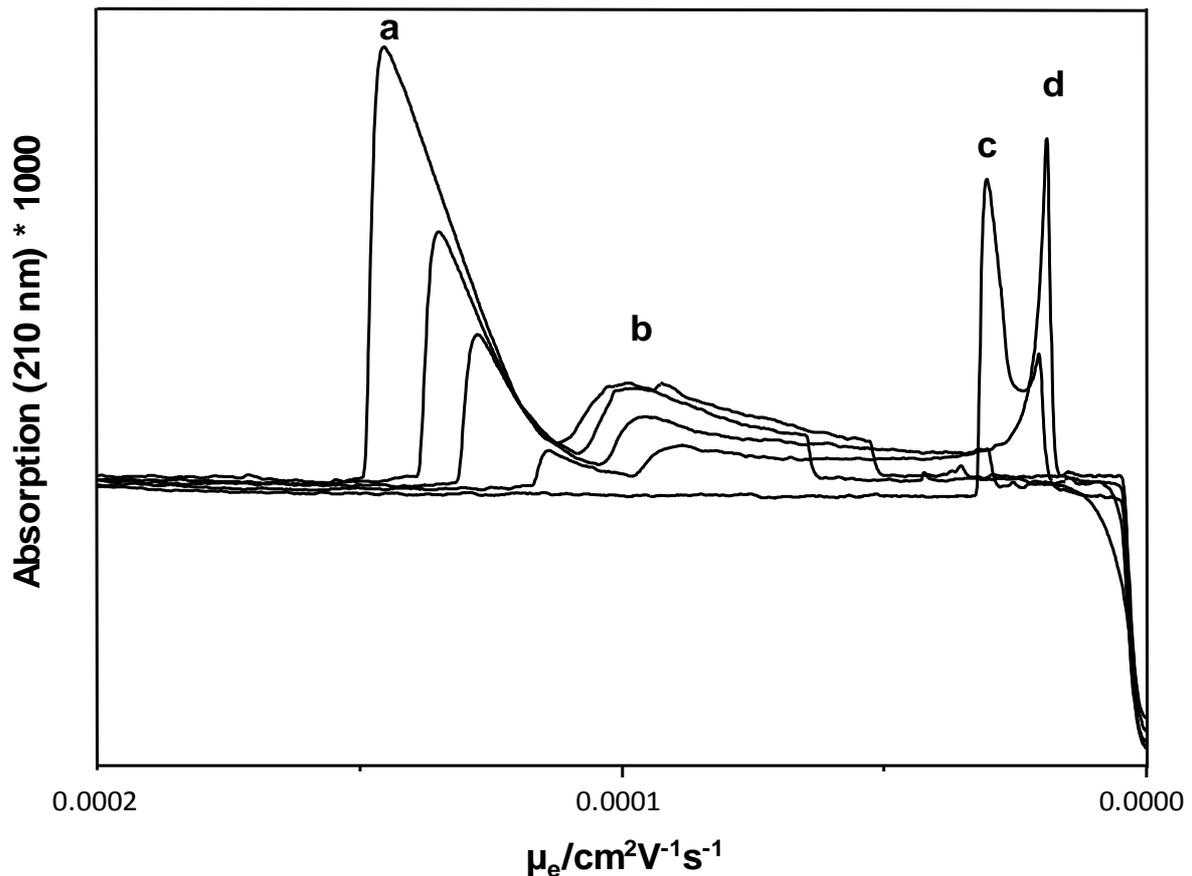


Abbildung 50: CE-UV-Spektren einer Kupfer-Histidin-Mischung mit 1mmol/l Histidin und 10, 30, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ Kupfer; a) freies Kupfer mit zunehmender Höhe bei zunehmender Konzentration, b) CuHis-Signal mit zunehmender Höhe bei zunehmender Konzentration (vermutlich $\text{Cu}(\text{His})_2$), c) CuHis-Signal nur bei geringster Cu-Konzentration (evtl. $\text{Cu}(\text{His})_3$), d) freies Histidin

Abbildung 51 zeigt die Leitfähigkeitsdetektion der gleichen Trennung einer Kupfer-Histidin-Mischung wie die oben gezeigte UV-Detektion mit der zweithöchsten Kupferkonzentration. Zum Vergleich ist die Trennung eines reinen Kupferstandards abgebildet. Dabei ist neben dem Kupfer-Histidin-Signal, das dem Signal b aus der UV-Detektion entspricht, ein weiteres Signal zu sehen, das dem Kupfersignal aus der Trennung des reinen Kupferstandards entspricht. Freies Histidin findet man in der Nähe des EOF.

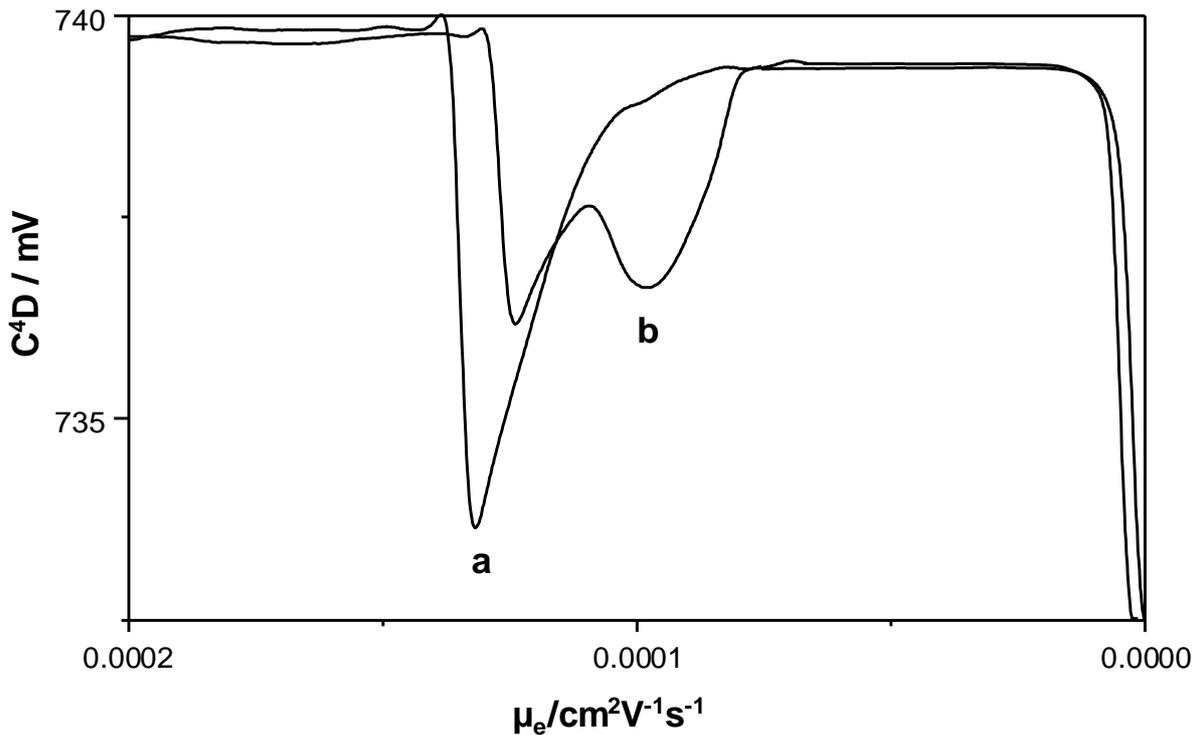


Abbildung 51: Leitfähigkeitsdetektion von CE-Trennungen mit C^4D von a) Cu^{2+} b) Histidin (1 mmol/l)+Kupfer 50 μ mol/l

Die Anwesenheit von unkomplexiertem Kupfer trotz des hohen Histidin-Überschusses mit beiden Detektionsarten zeigt, dass Kupfer-Histidin auch bei der CE-Trennung nicht vollständig stabil ist und einer teilweisen Dissoziation unterliegt. Dieses Ergebnis passt zu der IEF-Trennung (s. Kapitel 6.1.1), bei der Kupfer-Histidin während der Fokussierung vollständig dissoziierte. Auch die MS-MS-Fragmentierung zeigt für alle gemessenen Spezies mit Ausnahme der 1:2-Spezies eine starke Fragmentierung bereits bei niedriger Kollisionsenergie. Trotz der teilweisen Dissoziation ist die Trennung gut reproduzierbar und die Kalibration der Kupfersignale ist, wie in Abbildung 52 gezeigt, linear.

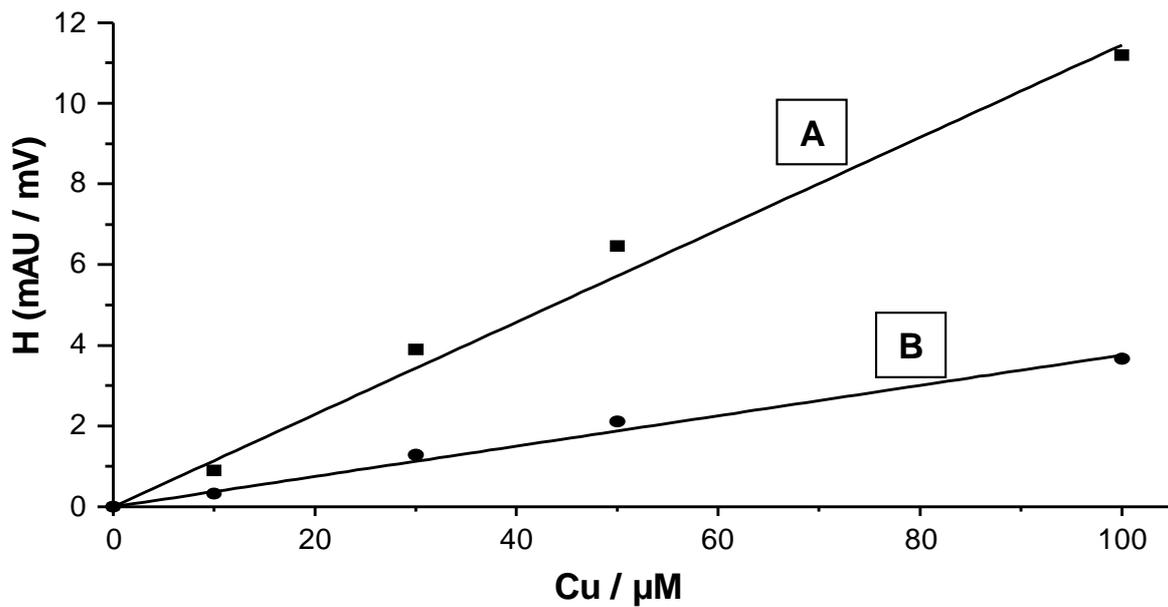


Abbildung 52: Kalibration des Kupfergehaltes in der CE-Trennung A) Leitfähigkeitsdetektion mit C^4D , B) UV-Detektion

Die Trennbarkeit labiler Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Spezies unter den vorgegebenen Trennbedingungen wurde in diesem Kapitel gezeigt. Die Eisen-Citrat-Spezies wurden in zwei Signale getrennt, die nach dem freien Citrat eluieren. Eines der Signale beinhaltet die 3:3-Spezies. In dem anderen Signal waren neben der 3:4-Spezies auch die 1:2- und die 2:2-Spezies zu finden. Durch die Ergebnisse der Fragmentierungsexperimente liegt es nahe, dass die 1:2- und 2:2-Spezies durch Fragmentierung der 3:4-Spezies bei der Detektion gebildet wurden. Wenn vier Spezies in Lösung vorlägen, wäre es sehr unwahrscheinlich, dass die Spezies chromatographisch nicht trennbar wären, da sie sich allein in ihrer Größe stark unterscheiden.

Die Auftrennung der Eisen-Citrat-Spezies in zwei Signale wurde mit einer CE-Trennung bestätigt. Selbst falls Spezies in der HILIC-Trennung koeluierten, wäre es umso unwahrscheinlicher, dass sie auch mit einem komplementären Trennverfahren in einem Signal zu finden wären. Das bestätigt die Schlussfolgerung, dass es sich bei den HPLC-Ergebnissen nicht um eine Koelution, sondern eine Fragmentierung der instabilen 3:4-Spezies handelt.

Auch die Kupfer-Histidin-Spezies wurden während der HPLC in zwei Signale aufgetrennt. Eines der Signale enthielt die 1:3-Spezies und koeluierte mit dem freien Histidin, das vermutlich zur Stabilisierung des im Fragmentierungsexperiment eher

instabilen Komplex beiträgt. Das zweite Signal enthielt die 1:2-, 2:4-, 3:3- und 3:5-Spezies. Auch hierbei ist es unwahrscheinlich, dass diese Spezies chromatografisch nicht trennbar sind. Vielmehr ist anzunehmen, dass es sich auch in diesem Fall um nur einen Komplex handelt. Der 1:2-Komplex wurde bereits in der Literatur als stabiler Komplex beschrieben, die großen Spezies können bei der ESI-Ionisierung gebildet worden sein.

Die CE-Messungen bestätigten das Auftreten zweier Komplexe. Es wurden neben freiem Histidin und Kupfer zwei positiv geladene Komplexe detektiert, von denen einer nur bei sehr großem Histidin-Überschuss gemessen wurde (1:3-Spezies), während das Signal des anderen Komplexes proportional zur Kupfermenge zunahm. Der 1:2-Komplex ist der einzige der nach der HILIC-Trennung detektiert wurde und der bereits beschrieben ist [124, 162]. Auch bei der Fragmentierung im MS² besaß die 1:2-Stöchiometrie die größte Stabilität.

Das in allen Messungen vorhandene freie Kupfer stammt aus der teilweisen Dissoziation der Komplexe während der Trennung. Das zeigt, dass es sich bei Kupfer-Histidin-Komplexen um eher labile Spezies handelt und es schwierig ist, sie unzersetzt zu trennen. Bei der Trennung der Eisen-Citrat-Komplexe liegt das Hauptproblem weniger in der Stabilität während der Trennung und mehr im Gleichgewicht mehrerer Spezies.

6.2.5 Anwendbarkeit der Trennmethode in biologischen Matrices

In den bisher durchgeführten Versuchen wurde die Trennbarkeit von Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Spezies in Modelllösungen auf den drei verschiedenen Säulenmaterialien gezeigt. Die Spezies wurden in einem HILIC-Verfahren voneinander und von den freien Liganden getrennt. Die bisherigen Versuche wurden allerdings mit Modellmischungen durchgeführt, die einen im Vergleich zu Pflanzen hohen Eisengehalt besitzen, dazu ohne pflanzliche Matrix. Um die Beurteilung von biologischen Fragestellungen zu gewährleisten, muss über das Trennverhalten unter Modellbedingungen hinaus die Anwendbarkeit der Trennmethode in sehr komplexen Pflanzenproben gegeben sein.

Dazu müssen folgende Punkte evaluiert werden:

- l) Hat die Pflanzenmatrix einen Einfluss auf die Trennung oder Detektion der Spezies?

- II) Sind die Metallspezies auch in natürlich vorkommenden Konzentrationen messbar?

Um diese Punkte zu klären, wurden im folgenden Kapitel Trennungen von Pflanzenproben mit zudotierten Metallspezies sowie von Pflanzenproben mit Metallspezies in Originalgehalten gemessen und ausgewertet.

HPLC-Trennung von Eisen-Citrat-Spezies aus Gerstenextrakt:

Um den Einfluss der Probenmatrix auf das Trennverhalten der identifizierten und getrennten Spezies zu untersuchen, wurde eine Pflanzenprobe (Gerstenextrakt) mit der Eisen-Citrat-Modellmischung (0,5:1 mM; entspricht 30 µg Fe/ml Probe) versetzt. Bei diesem Gerstenextrakt handelte es sich um einen Teil der in der weiteren Arbeit analysierten Probenreihe. So konnte mit Ausnahme der Metallkomplexkonzentrationen unter identischen Bedingungen (Matrix, Salze, etc.) gemessen werden (verglichen mit den Proben). Die dotierte Pflanzenprobe wurde danach einer HILIC-Trennung unterzogen.

Das Chromatogramm der angereicherten Probe (Abbildung 53) zeigt eine Auftrennung der Eisen-Citrat-Spezies in zwei Signale. Dabei eluiert die 3:3-Spezies (einfach und zweifach geladen, sowie das Wasseraddukt) im ersten Signal. Das zweite Signal setzt sich aus der 3:4-Spezies in zwei Ladungszuständen (einfach negativ und zweifach negativ) zusammen. Die 1:2- und 2:2-Spezies wurden nicht detektiert. Die Retentionszeiten der beiden Signale entsprechen denen im Modellsystem.

Somit wurden die zwei Stöchiometrien, die bereits in der Modelllösung stabil getrennt werden konnten, auch in realer Pflanzenmatrix getrennt.

Das zeigt, dass die Pflanzenmatrix keine großen Veränderungen des Spezies-Gleichgewichtes verursacht. Das Fehlen der 1:2- und 2:2-Spezies ist auf geringere Fragmentierung während der Ionisierung zurückzuführen. Auch Suppressionen der Spezies oder Überlagerungen durch Matrixbestandteile mit gleichem m/z wurden nicht gefunden. Somit hatte die Matrix keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der Spezies.

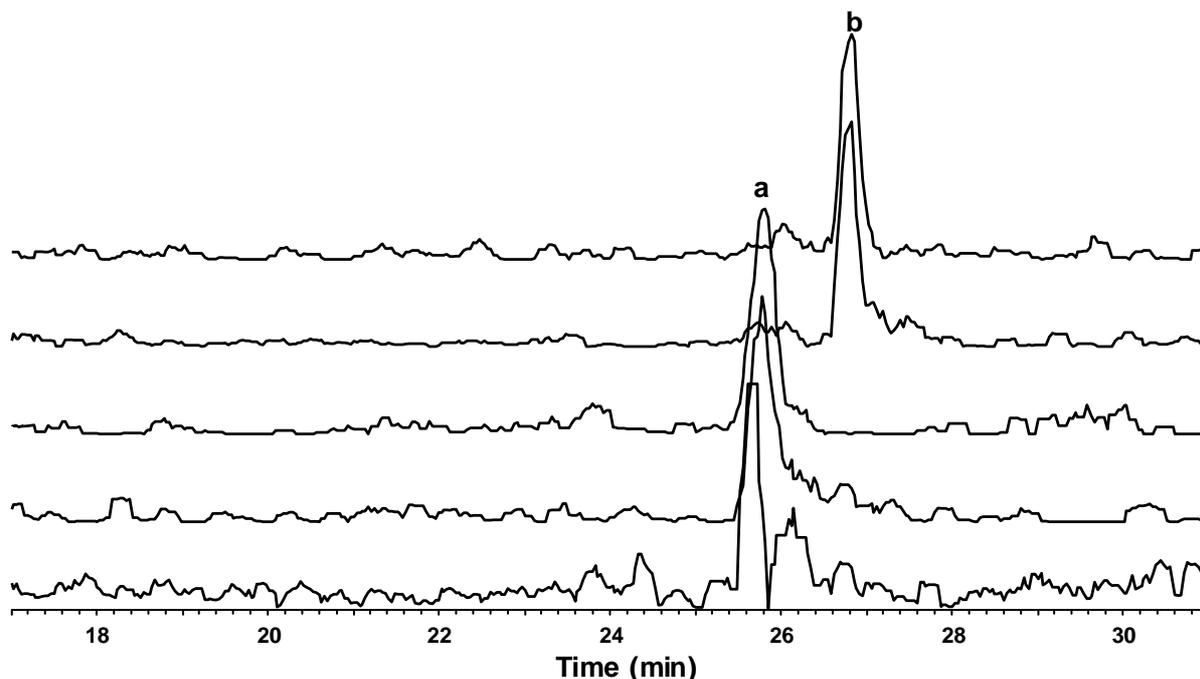


Abbildung 53: Chromatographische Trennung eines Extraktes von Gerstenblättern (*Hordeum vulgare*) dotiert mit Eisen-Citrat-Standard mit 0,5 mM/I Eisen und 1 mM/I (entspricht ca. 30 $\mu\text{g Fe/ml}$ in der Probe) Citrat auf einer Amidphase (Amide-80); a) $[\text{Fe}_3 \text{Cit}_3]^{2-}$, $[\text{Fe}_3 \text{Cit}_3 \text{H}_2\text{O}]^{2-}$, $[\text{Fe}_3 \text{Cit}_3]$, b) $[\text{Fe}_3 \text{Cit}_4]^{2-}$, $[\text{Fe}_3 \text{Cit}_4]$; Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 99:1 ACN/ H_2O bis 45:55 ACN/ H_2O ; 10 mM Ammoniumacetat

Der nächste Schritt beinhaltete die Trennung natürlicher (nicht zugesetzter) Konzentrationen von Eisen-Citrat-Spezies in der Pflanzenmatrix. In der Probenreihe, der die Pflanzenproben entstammen, wurden Eisenkonzentrationen von $>10 \mu\text{g/ml}$ Extrakt für die untersuchten Pflanzenteile bestimmt.

Die Untersuchungen dazu wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie durchgeführt. Dies war sinnvoll, da mit der Analysenmethode im weiteren Verlauf eine biologische Probenreihe gemessen wurde, die aus einer großen Zahl von Proben mit komplexer Matrix besteht. Durch die hohe Auflösung können koeluiierende Verbindungen mit ähnlicher m/z bei der Detektion ausgeschlossen werden und selbst geringe Konzentrationen der Spezies erfasst werden.

Für die Messungen wurde ein kürzerer Gradient verwendet, vor allem in Hinblick auf den großen Zeitaufwand großer Probenserien. Dadurch eluieren die Spezies zu kürzeren Retentionszeiten. Die Trennung selbst ändert sich dabei nicht.

In der Messung eines ungespikten Gerstenextraktes konnten drei Eisen-Citrat-

Spezies in einem Signal detektiert werden (Abbildung 54). Neben der $[\text{Fe}_3(\text{cit})_4]^-$ -Spezies konnten mit gleicher Retentionszeit auch die $[\text{Fe}(\text{cit})_2]^-$ - und die $[\text{Fe}_2(\text{cit})_2]^-$ -Spezies detektiert werden. Bereits während der Fragmentierungsversuche (Kapitel 6.2.3) wurde die einfache Fragmentierung der 3:4-Spezies in die 1:2- und 2:2-Spezies festgestellt und gefolgert, dass es sich bei den koeluiierenden Spezies um Fragmente der 3:4-Spezies handelt, die auf die Ionisierung zurückzuführen sind.

Das in der Modelllösung gemessene zweite Signal, das die 3:3-Spezies enthielt, wurde in der Pflanzenprobe nicht nachgewiesen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rellan-Alvarez et al. [25], die in Tomatenpflanzen nur die 3:3- und keine 3:4-Spezies nachwies. Dieser Unterschied lässt sich mit unterschiedlichen Citratgehalten in den Proben erklären. In den Gerstenextrakten liegt ein großer Citratüberschuss vor, der das Speziesgleichgewicht zur 3:4-Spezies verschiebt. Ein geringerer Citratgehalt in den Tomatenproben führt zur Bildung der 3:3-Spezies. Diese Gleichgewichtslage wurde in der Literatur beschrieben [26-27] und in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nachgewiesen.

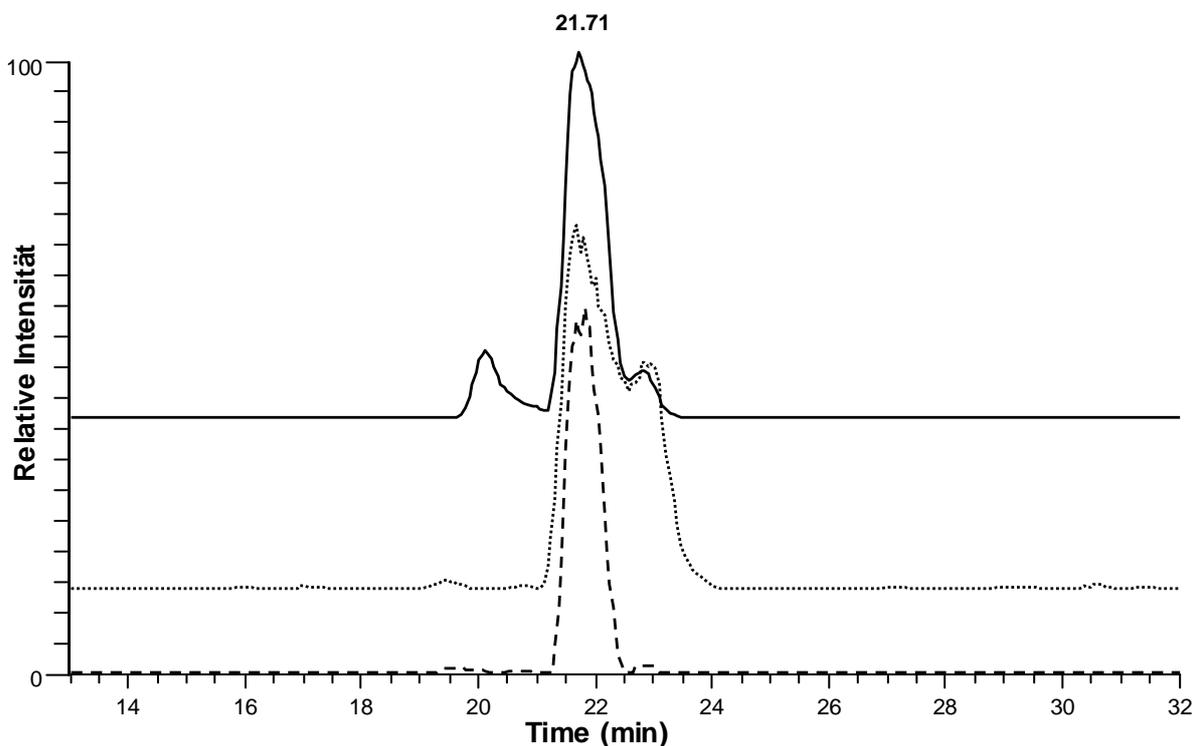


Abbildung 54: Eisen-Citrate in einem Wasserextrakt aus Gerstenblättern (h2E2OL); $-\text{[Fe}(\text{cit})_2\text{]}; \cdots \text{Fe}_2(\text{cit})_2\text{]}; \text{---[Fe}_3(\text{cit})_4\text{]};$ Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O

CE-Trennung von Eisen-Citrat-Komplexen in Pflanzenproben

Wie auch bei der Trennung der Modellmischungen, wurde die Trennung der Eisen-Citrat-Komplexe in Pflanzenmatrix mit einer CE-Trennung überprüft. Dabei sollte vor allem bestätigt werden, dass es sich bei dem Signal in der HILIC-Trennung um eine einzige Spezies und keine zufällige Koelution handelt.

Ein ungespikter Extrakt von Gerstenblättern wurde einer CE-Trennung unterzogen. Im Vergleich mit der Trennung der Modellmischung zeigte sich, dass nur eines der zwei Signale der Modellmischung, bei $3,25 \cdot 10^{-4} \mu\text{e}/\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, messbar war. Dieses Signal wurde bereits der 3:4-Stöchiometrie zugeordnet. Das Signal bei $3,8 \cdot 10^{-4} \mu\text{e}/\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ (das zur 3:3-Stöchiometrie gehört) war in der nicht angereicherten Probe nicht detektierbar. Das CE-Ergebnis bestätigt das Ergebnis der HPLC-Trennung. Mit beiden komplementären Techniken konnte nur eine der Eisen-Citrat-Spezies detektiert werden. Somit ist auszuschließen, dass die Abwesenheit der 3:3-Spezies ein Artefakt der HILIC-Trennung oder der Detektion ist. Da in den Proben große Mengen freies Citrat gemessen wurde, ist es logisch, dass gemäß des Trends in Abbildung 37 bei großem Ligandenüberschuss hauptsächlich die 3:4-Spezies gebildet wird.

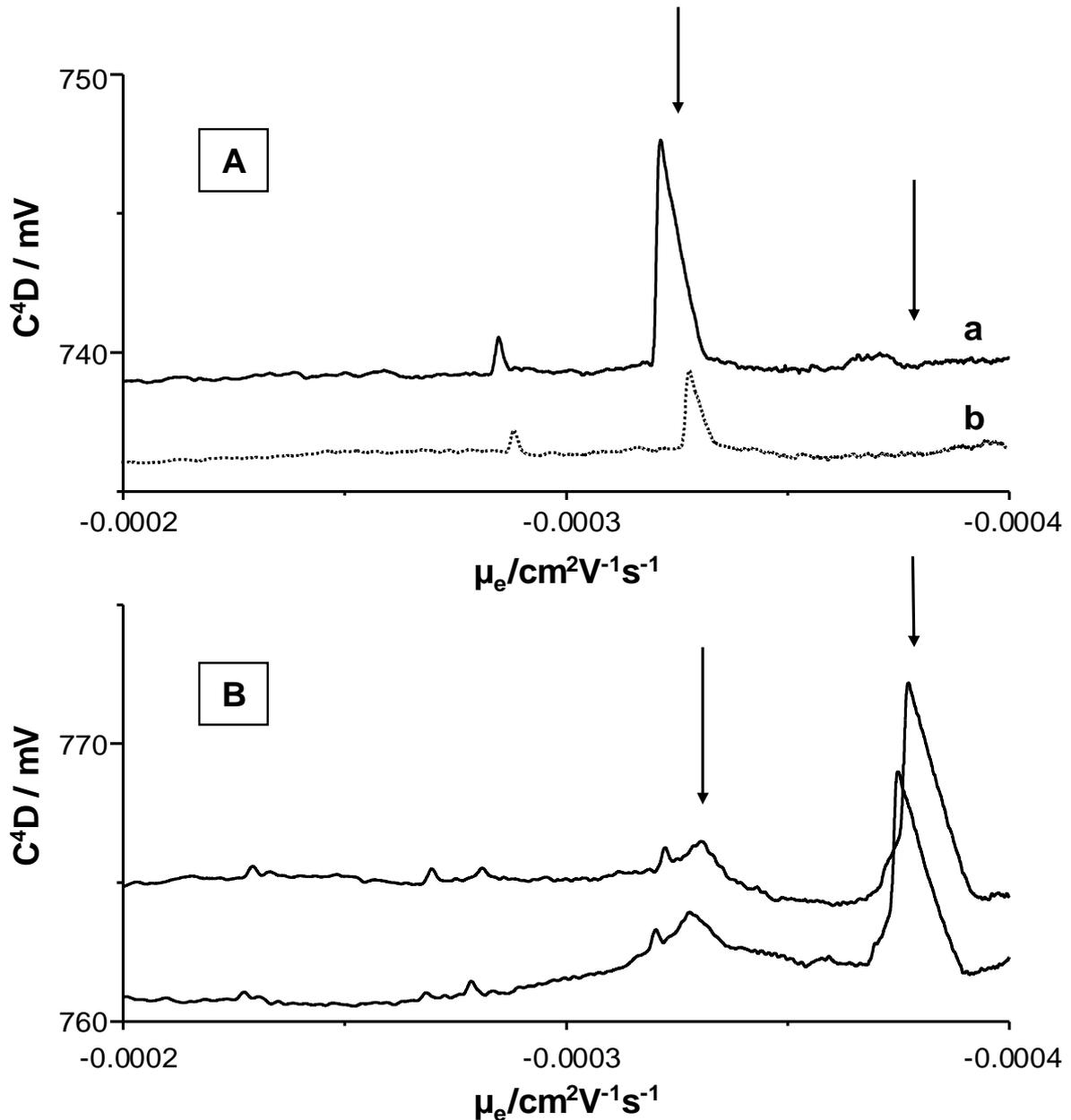


Abbildung 55: CE-Messung von Eisen-Citrat in zwei Proben (a, b) von Gerstenextrakten (A) und einer Eisen-Citrat-Modellmischung (zwei Replikate) (B); MES/TRIS (20/20 mM), pH 7,3

Im Folgenden werden zwei Proben mit verschiedenen Ernährungszuständen miteinander verglichen. Im Hinblick auf die Anwendung der Methode für die Analyse einer kompletten Probenserie musste untersucht werden, ob es möglich ist, signifikante Unterschiede zwischen zwei Pflanzenproben zu messen und die Proben anhand ihres Gehaltes an Eisen-Citrat-Spezies zu unterscheiden. Abbildung 56 zeigt deutlich, dass die Größe der Eisen-Citrat-Signale sich stark voneinander unterscheidet, wobei die Abweichungen bei der Dreifach-Bestimmung sehr gering

waren. Das bedeutet, dass es möglich ist, Eisencitratgehalte von Pflanzen mit unterschiedlichem Fe-Ernährungszustand zu unterscheiden.

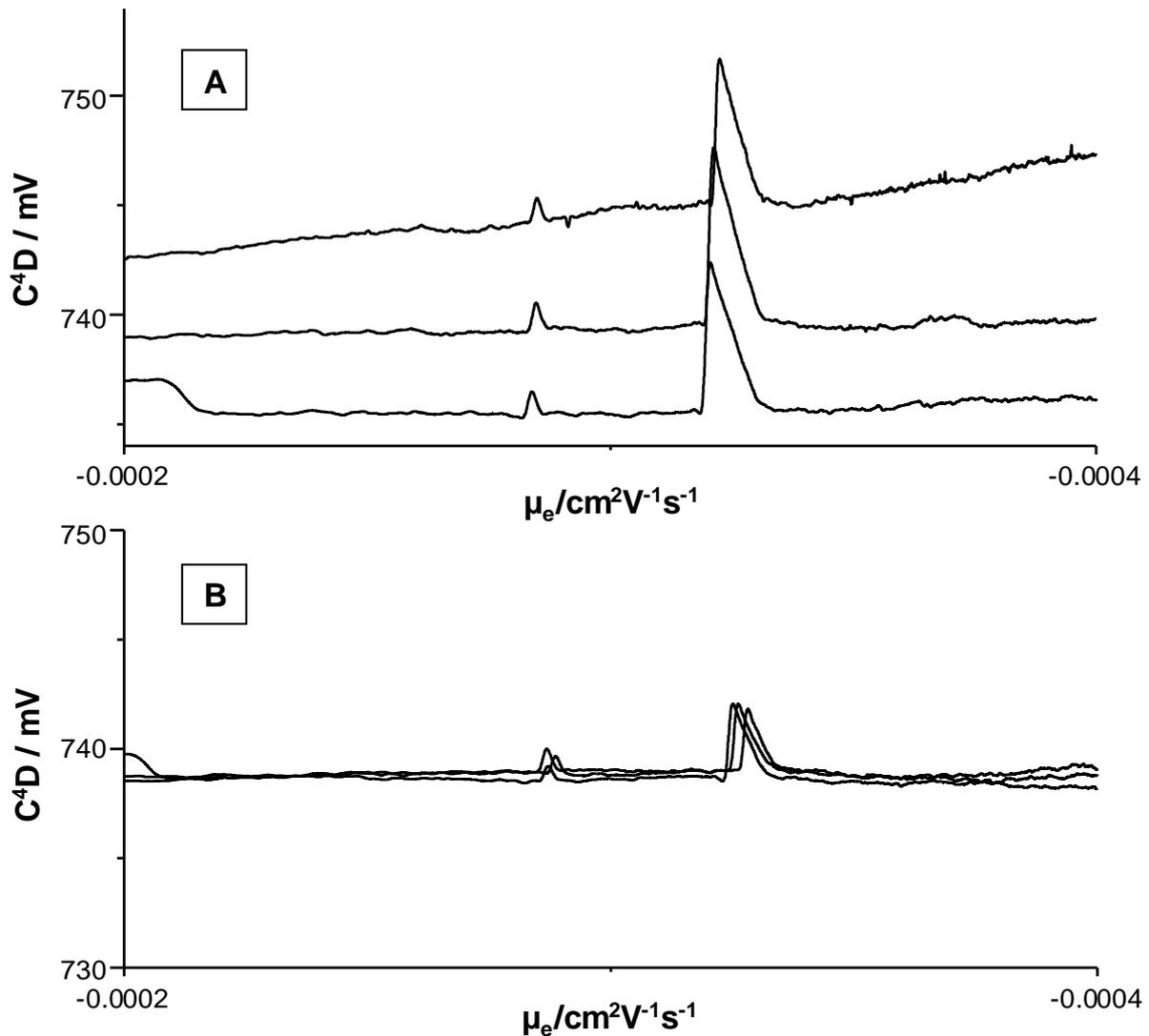


Abbildung 56: Messung von Eisen-Citrat-Spezies in zwei Gerstenextrakten (Versuch hE3OL), Vergleich von A) -Fe+S; B) CK+S; CE-Trennung von jeweils 3 Replikaten, MES/TRIS (20/20 mM), pH 7,3

Um die Zuordnung der CE-Signale zu den Eisen-Citrat-Spezies aus den HILIC-Trennungen zu untermauern, wurden die vergleichenden Quantifizierungen der CE-Trennung mit C^4D -Detektion mit den Ergebnissen der HILIC-Trennung mit MS-Detektion korreliert. Die Übereinstimmung der Signale der mit MS identifizierten Eisen-Citrat-Komplexe mit den CE-Signalen bestätigt, dass es sich bei den CE-Signalen um die vermuteten Spezies handelt.

Mit beiden Trenntechniken wurden deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Pflanzengruppen (Pflanzenproben aus unterschiedlichen

Behandlungen) gemessen. Die Ergebnisse beider Messungen sind in Abbildung 57 dargestellt.

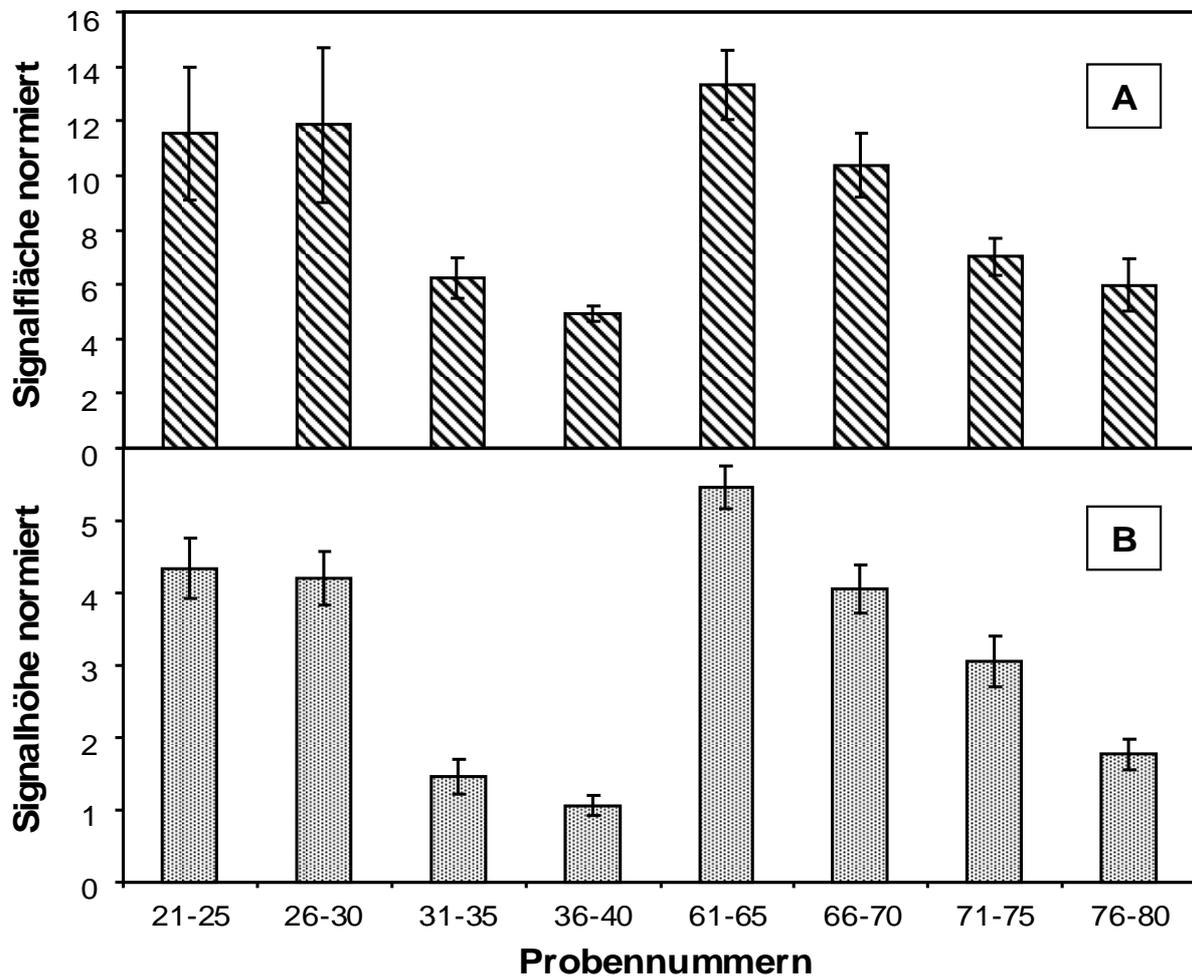


Abbildung 57: Übereinstimmung bei der Bestimmung von Eisen-Citrat(en) mit A) HPLC/MS und B) CE-C⁴D

Die oben abgebildeten Messungen stellen nur die Ergebnisse der C⁴D-Detektion dar, die Proben wurden parallel aber auch mit UV-Detektion gemessen. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde in Abbildung 58 dargestellt. Es wurde deutlich gezeigt, dass die Signale der verschiedenen Detektionen die gleichen Tendenzen abbilden und nur sehr geringe Abweichungen zeigen. Darüber hinaus zeigten die Messungen, dass die untersuchten Proben sich anhand der Eisen-Citrat-Gehalte deutlich unterscheiden und diese somit zur Charakterisierung herangezogen werden können. Für beide Detektionsarten wurde demonstriert, dass die biologischen Replikate eine geringe Standardabweichung besitzen (< 25 %), so dass die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Ernährungszuständen aussagekräftig

sind.

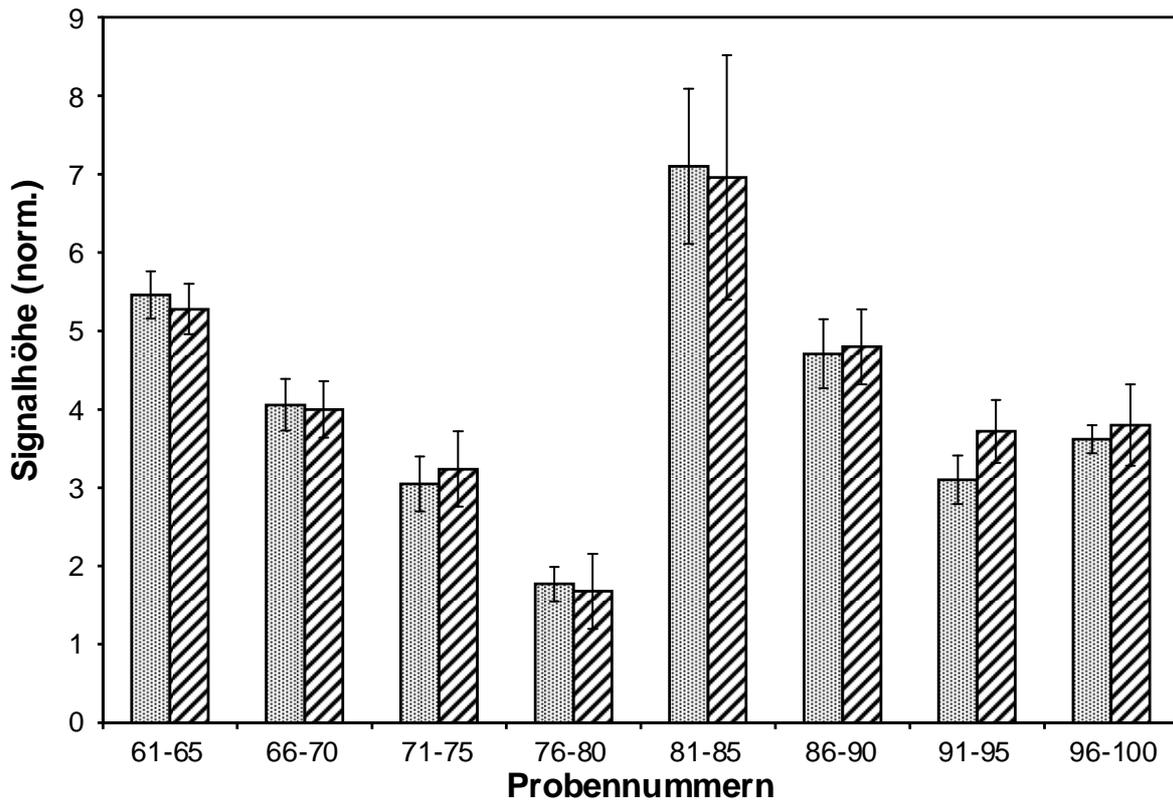


Abbildung 58: Demonstration der Vergleichbarkeit von UV- (gestreift) und C⁴D-Detektion (gepunktet) am Beispiel von Eisen-Citrat in Gersteextrakten, Standardabweichungen der Messungen von jeweils 5 Replikaten

HPLC-Trennung von Kupfer-Histidin-Spezies in Pflanzenproben:

Analog zur Untersuchung der Eisen-Citrat-Komplexe wurde auch der Einfluss der Matrix auf das Trennverhalten der Kupfer-Histidin-Spezies untersucht. Dazu wurde eine Gerstenextrakt-Probe mit der Kupfer-Histidin-Modellmischung versetzt und der HILIC-Trennung auf der Diolphase unterzogen.

Das Chromatogramm dieser Trennung weist zwei Signale für die Kupfer-Histidin-Spezies auf (Abbildung 59). Im ersten (a) koeluiert wie bei der Trennung der Modellmischungen die 1:3-Spezies mit dem freien Histidin. Das zweite Signal (b) enthält die [Cu₃ His₃]⁻, [Cu₂ His₄]⁻ und [Cu₃ His₅]⁻-Spezies. Das Ergebnis stimmt vollständig mit den Trennungen der Modellmischung überein. Auch die Retentionszeiten entsprechen denen der Spezies im Modellsystem. Somit wurden weder die Trenneigenschaften noch die Detektion der Kupfer-Histidin-Spezies durch die zusätzliche Pflanzenmatrix beeinflusst.

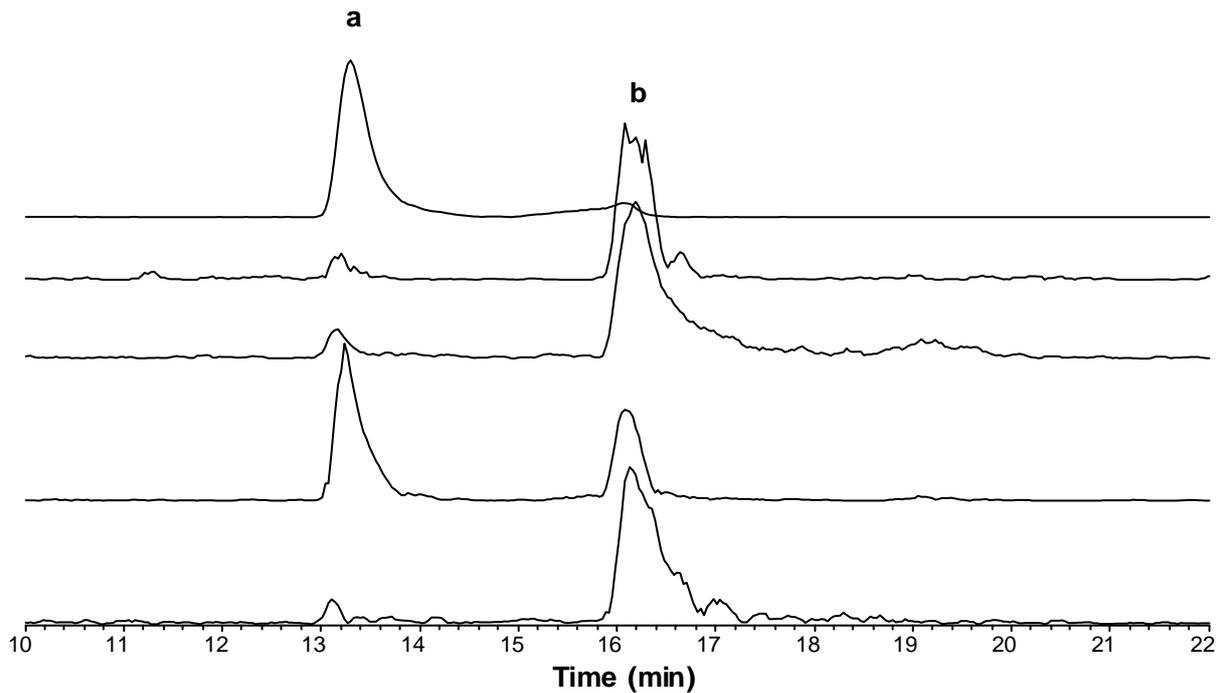


Abbildung 59: Trennung eines Extraktes von Gerstenblättern (*Hordeum vulgare*) gespickt mit Kupfer-Histidin-Standard mit 1 mM Kupfer und 5 mM Histidin auf einer Diolphase (Luna HILIC); a) Histidin, $[\text{CuHis}_3]$; b) $[\text{Cu}_3 \text{His}_3]$, $[\text{Cu}_2 \text{His}_4]$, $[\text{Cu}_3 \text{His}_5]$; Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 99:1 ACN/ H_2O bis 45:55 ACN/ H_2O ; 10 mM Ammoniumacetat

Eine nicht gespickte Pflanzenprobe wurde ebenfalls mit einem verkürzten Gradienten getrennt und mit hochauflösender MS detektiert. In dieser Probe war nur eine Kupfer-Histidin-Spezies, $[\text{Cu}_2 (\text{His})_4]^-$, detektierbar (Abbildung 60).

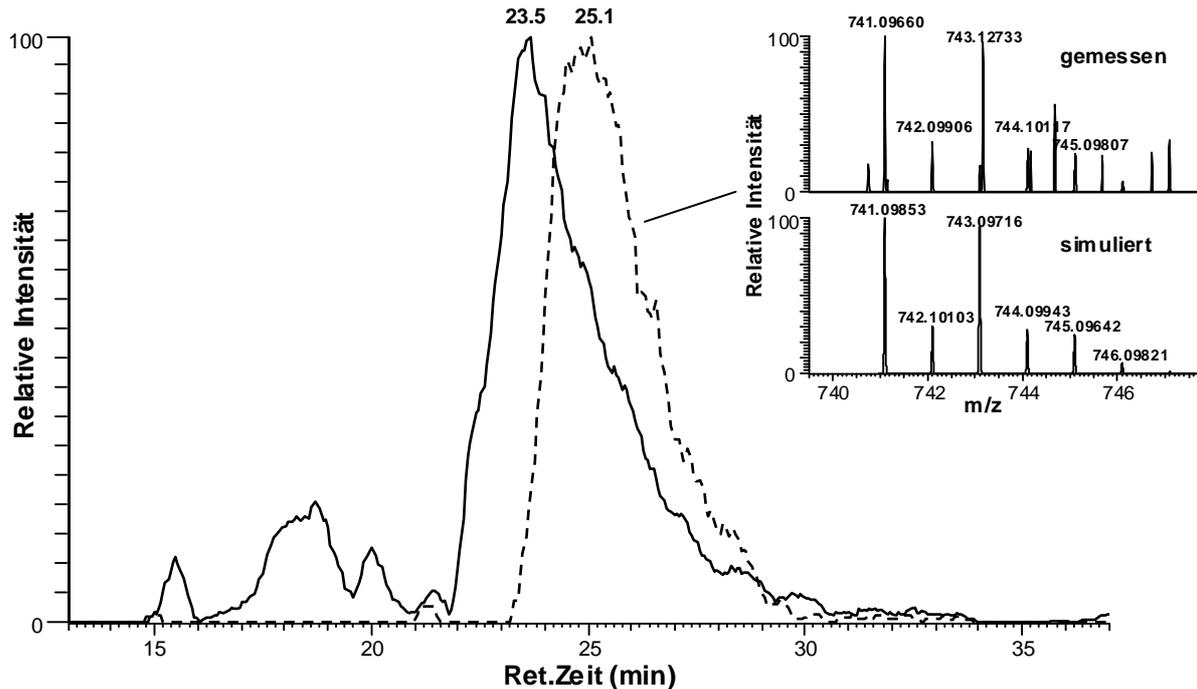


Abbildung 60: Freies Histidin und Kupfer-Histidin in einem Wasserextrakt aus Gerstenblättern; durchgezogene Linie: freies Histidin, gestrichelte Linie: $[\text{Cu}_2(\text{His})_4]$; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O; Isotopenmuster von $[\text{Cu}_2(\text{His})_4]$, Vergleich Messung und Simulation mit Xcalibur (Profile, R: 25000, FWHM)

Die Aufklärung von Metall-Verlagerungsprozessen innerhalb der Pflanze macht aufgrund der Komplexizität der Proben eine Trennung notwendig [164]. Für die in dieser Arbeit untersuchten Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Spezies existierte aufgrund der geringen Stabilität und der unbekanntem Identität der im Gleichgewicht vorliegenden Spezies bisher keine zuverlässige Trennmethode. Es war weder bekannt, ob Eisen-Citrat und Kupfer-Histidin überhaupt ohne Zersetzung oder Artefakte mit einer Trennmethode zu analysieren sind, noch, welche Spezies vorliegen, bzw. ob diese Spezies stabil sind oder sich ineinander umwandeln.

Daher wurde in diesem Kapitel die Entwicklung einer Trennmethode für die oben genannten Spezies gezeigt. Die Spezieszusammensetzung der eingesetzten Modelllösungen wurde mit MS und MS² untersucht.

Aufgrund der in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse konnte eindeutig gezeigt werden, dass

- I) Mit der entwickelten HILIC-ESI-MS-Methode Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Spezies in wässrigen Modellsystemen jeweils in zwei Signale trennbar sind*
- II) Die Trennung von Eisen-Citrat- als auch Kupfer-Histidin-Spezies in Pflanzenmatrix sowohl mit zudotierten Spezies-Gehalten als auch mit Originalgehalten verlässlich funktioniert*
- III) Die Methode geeignet ist, verschiedene Proben einer Probenserie anhand ihrer Speziesgehalte zu charakterisieren*
- IV) Die Interpretation der Ergebnisse der HILIC-Trennung mit Hilfe von MS²-Untersuchungen und CE-Trennungen bestätigt wurde*

6.3 Untersuchung von Metallspezies-Gleichgewichten in Pflanzen

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Entwicklung von neuen Methoden vorgestellt, die die Möglichkeit bieten, labile Metallkomplexe zu analysieren. Es wurde eine Konzentrierungsmethode entwickelt, die es ermöglicht, Metallkomplexe unzerstört zu konzentrieren und vorzutrennen, um eine weitergehende Trennung der Analyten zu vereinfachen bzw. zu ermöglichen. Für die Trennung labiler Metallkomplexe wurde eine HILIC-ESI-MS-Methode entwickelt. Es wurde gezeigt, dass mehrere Spezies zweier wichtiger Metall-Liganden-Systeme, Eisen-Citrate und Kupfer-Histidine, mit dieser Methode unzerstört getrennt und detektiert wurden. Der Trennmechanismus wurde anhand von Modellmischungen untersucht und die Anwendbarkeit der Methode für komplexere Pflanzenmatrices wurde am Beispiel einzelner Pflanzenproben demonstriert.

Damit existiert eine analytische Methode, um reale Fragestellungen den Metalltransport betreffend zu bearbeiten. Die Bearbeitung biologischer Fragen stellt über die Entwicklung verlässlicher Trennverfahren hinaus besondere Anforderungen an die Analyse. Biologische Untersuchungen umfassen eine große Anzahl von Proben, was zu langen Messperioden und großer Matrixbelastung führt. Dadurch kann es zum Verlust der Vergleichbarkeit der Messungen kommen, weshalb besondere Maßnahmen zur Qualitätssicherung erforderlich sind (s. Kapitel 6.3.1).

Unter Beachtung dieser Maßnahmen wurde eine vollständige Probenreihe mit der entwickelten HILIC-ESI-MS-Methode untersucht. In der vorliegenden Probenreihe geht es um die Retranslokation von Eisen in seneszenten Pflanzen (s. Kapitel 3.2). Biologische Zielsetzung war es, die Einflüsse von Eisenmangel und Seneszenz (durch Stickstoffmangel, bzw. durch Beschattung der älteren Blätter) auf die Remobilisierung von Eisen aus älteren Blättern zu untersuchen. Die Probenreihe ist ein Teil eines Versuchsprojektes in Kooperation mit dem IPK Gatersleben zur Eisentranslokation bei Seneszenz. Die umfassende biologische Auswertung der Messergebnisse findet daher am IPK Gatersleben statt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Methode so robust und aussagekräftig ist, dass damit biologische Fragestellungen beantwortet werden können und es sollten analytische Ergebnisse generiert werden, die Aussagen über vorliegende Spezies und deren Änderungen erlauben.

6.3.1 Voraussetzungen für die Beantwortung biologischer Fragestellungen

Die speziellen Voraussetzungen für die HILIC-Trennung labiler, nicht-kovalenter Metallkomplexe wurden bereits bei der Entwicklung der HILIC-ESI-MS-Methode (Kapitel 6.2.1) erörtert. Darüber hinaus bringt die Analyse biologischer Probenreihen spezielle Anforderungen durch die großen Probenzahlen mit sich. Reale biologische Probenreihen umfassen neben verschiedenen Zuständen die jeweils zugehörigen Kontrollen und die damit einhergehenden biologischen Replikate (in dieser Probenreihe 5fach). Durch die großen Probenzahlen ergeben sich Probenmesszeiten über mehrere Tage und eine große Matrixbelastung. Folgende Aspekte müssen daher beachtet werden:

- I) Vergleichbarkeit der Daten über das gesamte Messintervall:
Bei Messungen über einen längeren Zeitraum besteht die Gefahr, dass sich die Trenn- oder Detektionsbedingungen verändern. Besonders bei komplexen Matrices mit unbekanntem Bestandteilen kann es beispielsweise zu Veränderungen der Säulenmaterialien durch Adsorptionen kommen. Auch das Massenspektrometer kann durch Matrixbestandteile verunreinigt werden, so dass sich Ionisations- oder

Detektionsbedingungen ändern.

Um die Vergleichbarkeit der Messungen über den gesamten Zeitraum zu gewährleisten, wurden einzelne Proben zu verschiedenen Zeitpunkten erneut analysiert. Ausgesuchte Metaboliten wie freies Citrat und Aminosäuren wurden wiederholt gemessen und es wurde sichergestellt, dass die Abweichung der Gehalte $<10\%$ war.

II) Reproduzierbarkeit und Memoryeffekte:

Die hohe Probenanzahl birgt die Gefahr von Memoryeffekten (besonders bei automatischen Messungen mehrerer Proben über Nacht ohne laufende Kontrollen): Zur Kontrolle auf Memoryeffekte wurde nach jeweils 5 Proben ein Blindwert injiziert, der keinerlei Signale in der MS-Detektion in den fraglichen Massenspuren aufweisen durfte. Außerdem wurde die Reproduzierbarkeit durch Vierfach-Messungen derselben Probe überprüft. Die gemessenen Intensitäten für ausgewählte Metaboliten, wie freies Citrat und Aminosäuren, wichen dabei $<10\%$ ab.

III) Standardabweichung:

Bei den in der Probenreihe gemessenen Replikaten (Fünffach-Messungen) handelt es sich um fünf einzeln aufgearbeitete Pflanzen, die separat gezogen und unter den gleichen Bedingungen ernährt wurden. Daher musste sichergestellt sein, dass die Abweichung der Replikate signifikante Unterschiede zwischen den Probengruppen erkennen lässt: Die biologischen Standardabweichungen sind exemplarisch am Beispiel des freien Citrates in Abbildung 61 gezeigt und bewegen sich im Bereich von 3% bis 26% Abweichung, wobei bei sehr kleinen Analytmengen Abweichungen bis 53% gemessen wurden. Die biologischen Standardabweichungen anderer Metallkomplexe und Metabolite liegen in vergleichbaren Bereichen.

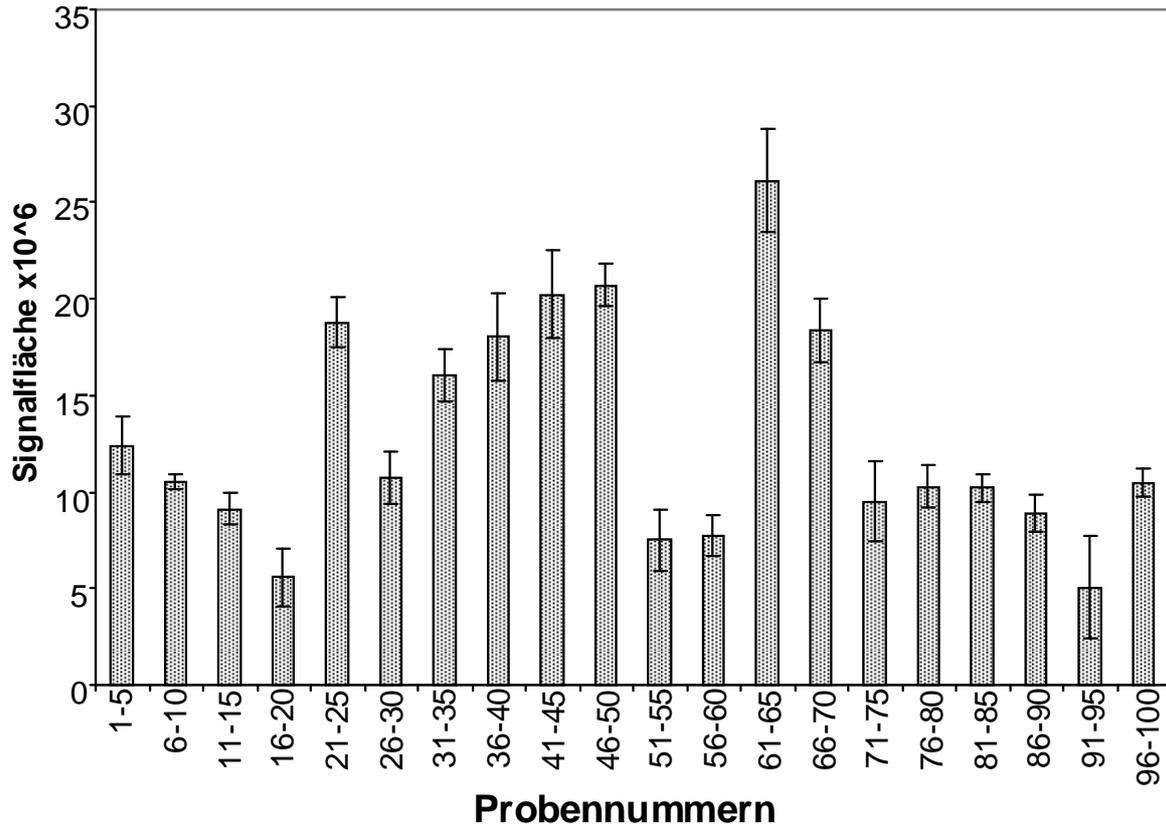


Abbildung 61: Standardabweichungen bei den Messungen der biologischen Replikate (jeweils 5 Proben) dargestellt am Beispiel des Citrates; alle anderen Analyten zeigten vergleichbare Abweichungen

Für die Messung der gesamten Probenserie wurde statt des niedrig auflösenden ein hoch auflösendes Massenspektrometer verwendet. Die höhere Auflösung ermöglichte die Unterscheidung von kritischen Paaren, deren Massendifferenz so gering ist, dass sie mit Niedrigauflösung nicht unterscheidbar waren. Dadurch ließ sich der Gradient verkürzen, da Überlagerungen besser ausgeschlossen werden konnten. Somit konnte die benötigte Laufzeit für die Messserie um ein Viertel verkürzt werden.

6.3.2 Metallkomplexe

Eisen-Citrate und Kupfer-Histidine

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Trennung der zwei wichtigen Metall-Liganden-Systeme, Eisen-Citrat und Kupfer-Histidin, bewiesen

- I) die Trennbarkeit verschiedener Spezies

- II) die eindeutige Identität der Spezies
- III) die Abwesenheit von Störungen, bzw. Artefakten
- IV) die Detektierbarkeit bei realen Konzentrationen

Es bleibt allerdings noch zu zeigen, dass die entwickelten Methoden in der Lage sind, reale biologischen Fragestellungen zu beantworten, d. h. relative Konzentrationsunterschiede der Metallspezies in Abhängigkeit vom pflanzenphysiologischen Zustand eindeutig (statistisch signifikant) zu unterscheiden. In der vorliegenden Probenreihe wurde der Effekt von Eisenmangel und Seneszenz auf die Eisenverteilung, bzw. die Retranslokation aus seneszenten Blättern untersucht. Man geht davon aus, dass sowohl unter Eisenmangel als auch bei Seneszenz proteingebundenes Eisen in den Blättern mit kleinen Liganden aus dem seneszenten Blatt in die jungen Blätter transportiert wird [168]. Eine gängige Hypothese geht davon aus, dass Citrat als einer der wichtigsten Liganden im Transport von Eisen an der Translokation beteiligt ist. Daher sollte dieser Zusammenhang anhand der Eisen-Citrat-Speziesgehalte verifiziert werden.

Die in Kapitel 6.3.1 aufgeführten Vorkehrungen zur Absicherung der Qualität der Messungen wurden wie oben genannt durchgeführt. Die Abweichungen der Wiederholungsmessungen zur Reproduzierbarkeit (4fach-Messungen) und zur Wiederholbarkeit über den gesamten Messzeitraum liegen in den oben genannten Grenzen. Zur Kontrolle auf Memoryeffekte wurden die jeweiligen zu untersuchenden Massenspuren der Blindwerte analysiert. Dabei wurden keine Memoryeffekte festgestellt.

Bei der Auswertung der PS-Metall-Komplexe (Abbildung 64 -Abbildung 66) wurden in einzelnen Probengruppen hohe Gehalte von Metall-PS-Komplexen gefunden, in den davor und danach gemessenen Probengruppen, wie auch in den Blindwerten wurden keine Komplexe detektiert. Dies wäre nicht möglich, wenn es Verschleppungen bei den Messungen gäbe. Somit sind die grundlegenden Bedingungen für die Auswertung der gesamten Probenreihe erfüllt. Anhand dessen wird deutlich, dass Memoryeffekte bei der Messung der Probenreihe keine Rolle spielen.

Bei der Trennung der Eisen-Citrat-Komplexe in der biologischen Untersuchungsreihe (s. Abbildung 62) wurden drei Spezies nachgewiesen: $[\text{Fe}(\text{cit})_2]^-$, $\text{Fe}_2(\text{cit})_2^-$,

$\text{Fe}_3(\text{cit})_4^-$). Das entspricht den oben identifizierten Eisen-Citrat-Spezies in einer Pflanzenprobe (Kapitel 6.2.5). Die Komplexe wurden in allen Proben identifiziert, die Gehalte der Spezies variierten signifikant. Die größte Signalfäche der Eisen-Citrat-Komplexe besaß in allen Proben die 2:2-Spezies.

Im Vergleich der unterschiedlichen Ernährungszustände stachen die hohen Eisen-Citrat-Gehalte der Eisenmangel-Proben sowohl unter Eisenmangel kombiniert mit Stickstoffmangel bzw. Beschattung als auch nur unter Eisenmangel heraus (h2 E2 SOL -Fe-N/-Fe, h E3 SOL -Fe+S/-Fe und h2 E2 OL -Fe-N/-Fe). Die ältesten Blätter mit Eisenmangel und Beschattung (h E3 OL -Fe+S/-Fe) wiesen nur gering erhöhte Eisen-Citrat-Gehalte auf. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Annahme, dass unter Eisenmangel die Freisetzung von Eisen aus Proteinbindung und der Transport aus älteren Blättern in junge Blätter in Form wasserlöslicher, kleiner Komplexe stattfindet [15, 60]. Ausnahmen davon bildeten die schon nach vier Tagen genommenen Probengruppen (h1), deren Eisenmangelproben keine auffällig hohen Eisen-Citrat-Werte aufwiesen.

Die gleiche Tendenz bei der Eisen-Citrat-Verteilung findet sich auch in der Citrat-Verteilung (Abbildung 61). Die Proben, die große Gehalte an Eisen-Citrat aufwiesen, enthielten auch entsprechend mehr freies Citrat als die Vergleichsproben. Die starke Zunahme des Citratgehaltes entspricht den bisherigen Berichten [169] über die Reaktionen auf Eisenmangel, die für Tomate, Lupine und Zuckerrüben existieren. Die Ergebnisse bestätigen somit die Annahme, das Citrat ein wichtiger Ligand für die Retranslokation von Eisen bei Eisenmangelzuständen ist.

Das Auslösen von Seneszenz veränderte die Eisen-Citrat-Komplex-Gehalte nur wenig, nur bei zwei Vergleichspaaren (h E3 SOL -Fe+S/-Fe und h2 E2 OL -Fe-N/-Fe) war der Gehalt unter Beschattung bzw. mit Stickstoffmangel im Vergleich zur Kontrolle gesteigert.

Bei den Messungen der drei Eisen-Citrat-Spezies war sichtbar, dass das Verhältnis der Spezies untereinander nicht konstant war. Theoretisch könnte das auf unterschiedliche Entstehungsweise oder unterschiedliche Transportmechanismen für die verschiedenen Spezies zurückzuführen sein. Aufgrund der chromatographischen Trennung in einem Signal und der CE-Trennung, in der ebenfalls nur ein einziges Signal detektiert wurde, wurde eine gemeinsame Elution der unterschiedlichen Spezies in beiden komplementären Trennverfahren aber ausgeschlossen. Es ist davon auszugehen, dass neben dem Auftreten von Schwankungen in der Ionisierung

der Analyten die Standardabweichung der Messungen eine maßgebliche Rolle spielt. Die Intensität der kleineren Signale liegt nur knapp über der Nachweisgrenze, was zu Ungenauigkeiten in der Detektion führt.

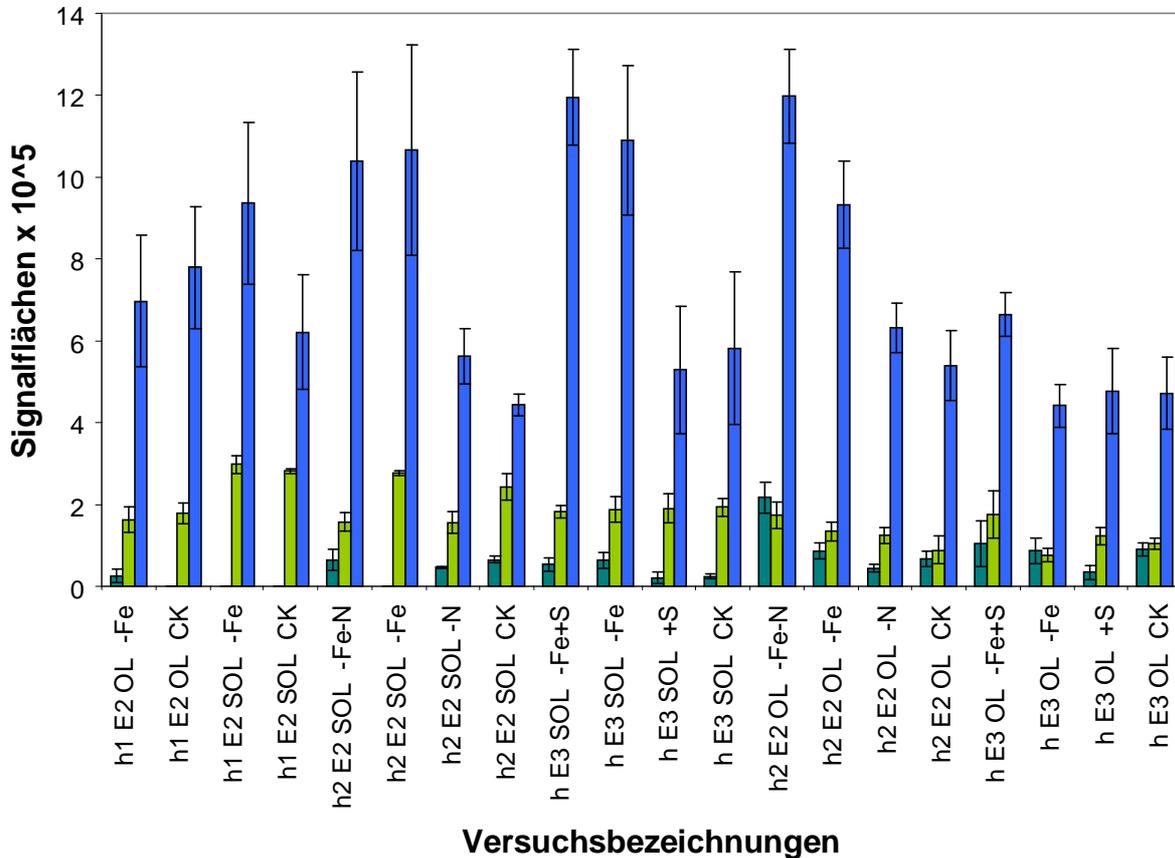


Abbildung 62: Eisen-Citrate in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.43; dunkelgrün: [Fe(cit)₂]; blau: Fe₂(cit)₂; hellgrün [Fe₃(cit)₄]; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O

Bei der Analyse der Kupfer-Histidin-Spezies in den Proben wurde nur ein Kupfer-Histidin-Komplex nachgewiesen (Abbildung 63). Der identifizierte [Cu₂ (His)₄]⁻-Komplex wurde nur in einigen Proben gefunden, bei denen es sich ausschließlich um die ältesten Blätter (OL aus E2 und E3) handelt. In den Blättern mit Beschattung wurde weniger Kupfer-Histidin gefunden als in den Blättern mit Stickstoffmangel. Bei den Eisenmangelproben wurden große Unterschiede zwischen den verschiedenen Experimenten gemessen. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch für die Kupfer-Histidine deutliche Unterschiede gemessen wurden und die Methode somit

grundsätzlich für die Analytik dieser Komplexe geeignet ist.

Der Mechanismus, der der Verteilung der Kupfer-Histidin-Spezies unter den verschiedenen Ernährungszuständen zugrunde liegt, ist noch unbekannt. Der Grund für die geringen Mengen detektierter Kupferkomplexe liegt in der durchgängigen Versorgung der Pflanze mit Kupfer während der gesamten Versuchsphase. Dadurch ergaben sich keinerlei Kupfermangelzustände, die eine Retranslokation von Kupfer auslösen würden. Somit bleibt das Kupfer in den Blättern erwartungsgemäß protein- und peptidgebunden und wird nicht in wasserlösliche Komplexe überführt, die mit der verwendeten Methode messbar sind.

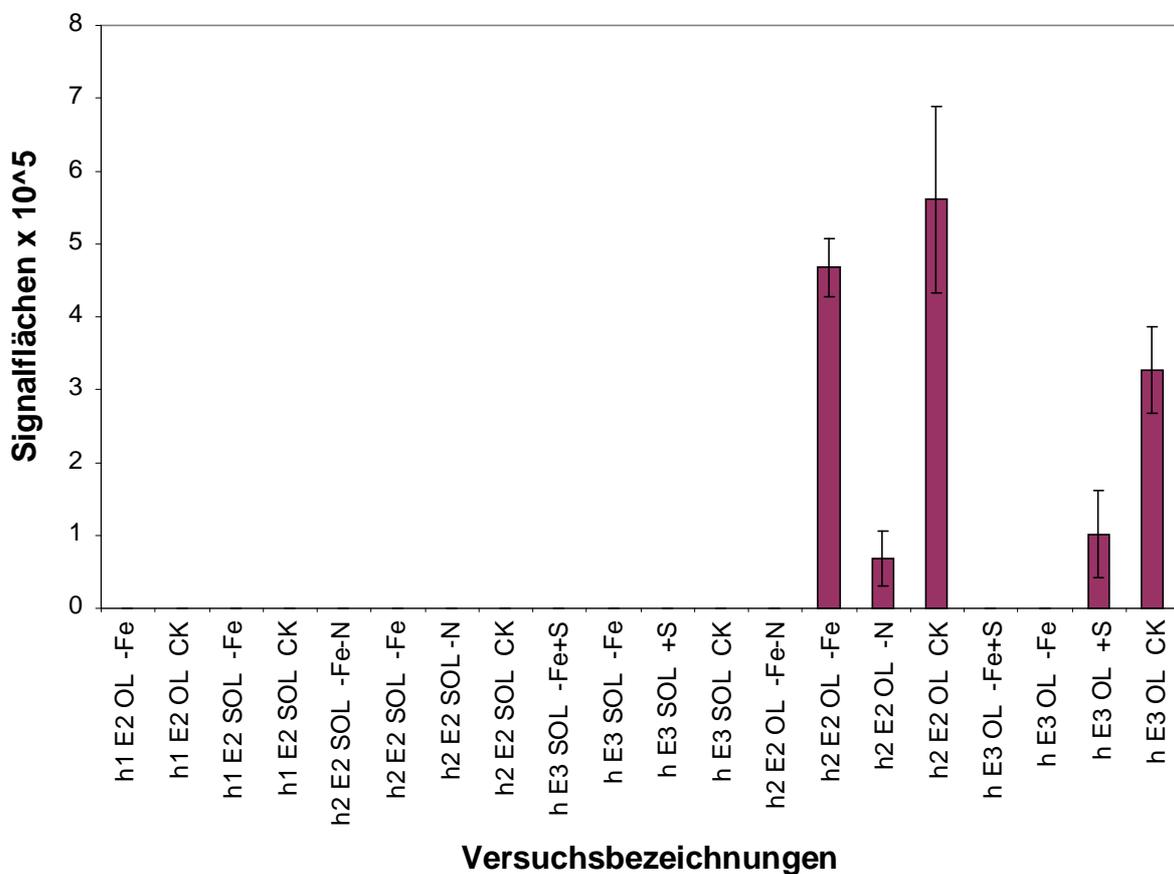


Abbildung 63: Kupfer-Histidin, $[Cu_2 (His)_4]$ in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.43; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O

Die Detektion von Eisen-Citrat (1:2, 2:2, 3:4) und der Kupfer-Histidin-Spezies (2:4) in der Probenreihe zeigt, dass die entwickelte HILIC-ESI-MS-Methode gut geeignet ist, um verschiedene Proben in Bezug auf ihre Eisen-Citrat-Gehalte eindeutig zu

unterscheiden. Die gezeigten Tendenzen, dass bei Eisenmangelzuständen sowohl die Gehalte an freiem Citrat als auch an Eisen-Citraten erhöht sind, entsprechen den in der Literatur bereits dokumentierten Trends, nach denen in unterschiedlichen (Strategie-I-) Pflanzen die Metabolite des Citrat-Zyklus in erhöhten Gehalten gemessen wurden.

Phytosiderophor- und Nicotianamin-Metallkomplexe

Die Phytosiderophore (PS) sind für die Eisen- (und Metall-) Aufnahme von Strategie-II-Pflanzen zuständig und bilden genauso wie NA ausschließlich 1:1-Komplexe mit zwei- und dreiwertigen Metallen [37]. Die Biosynthese von PS findet in den Wurzeln statt und wird durch Eisenmangel hochreguliert, so dass es zu verstärkter Abgabe in die Rhizosphäre kommt [170-171]. Es existieren darüber hinaus Hinweise, dass auch in Blättern von Strategie-II-Pflanzen unter Eisenmangel PS-Biosynthese stattfindet [172-173]. Es wurden jedoch bisher noch keine Metall-PS-Komplexe in Blättern nachgewiesen. Gerste bildet verschiedene PS, MA, DMA sowie epi-HMA (je nach Kultivar auch nicht alle) [57, 174], was die Toleranz gegenüber Eisenmangel im Vergleich zu anderen Getreidesorten erhöhen kann [175]. Da für die Gerstenblätter keine Informationen über die gebildeten PS vorliegen, wurden in der gemessenen Probenreihe die MA, DMA, epi-HMA-Komplexe von in Pflanzen wichtigen Metallen (Eisen, Kupfer, Nickel, Zink, Mangan) untersucht. Es sollte geklärt werden, welche PS im gegebenen Kultivar tatsächlich anzutreffen sind, welche Metall-PS-Komplexe gebildet wurden und in welchen relativen Verhältnissen die PS und Komplexe vorliegen.

Bei der Auswertung der PS-Komplexe (Abbildung 64 bis Abbildung 66) wurden in zwei verschiedenen Pflanzenproben PS-Komplexen gemessen. Bei diesen zwei Proben handelt es sich um das älteste und zweitälteste Blatt der Pflanzen unter Eisenmangel. In beiden Proben wurden intensive Signale von Fe(III)-MA, Fe(III)-DMA und Fe(III)-epi-HMA (Fe(III)-HMA oder Fe(III)-HDMA) gemessen. Auch die Zn(II)-PS-Komplexe waren in beiden Blättern in hohen Gehalten zu finden. Die Mn(II)-Komplexe fanden sich dagegen nur im zweitältesten Blatt. Weniger intensive Peaks der anderen Metallkomplexe waren ebenfalls im ältesten und zweitältesten Blatt vertreten. In den zugehörigen Vergleichspflanzen, die neben dem Eisenmangel auch Stickstoffmangel ausgesetzt waren, waren keine PS-Komplexe messbar.

Eine Erklärung für das Fehlen von PSen in der -Fe-N-Vergleichsgruppe ist, dass im Mangelzustand stickstoffhaltige Substanzen, wie z. B. Methionin als Ausgangsstoff für die Synthese, sowie Enzyme wie NA-Synthase und NAAT (NA Aminotransferase) nicht ausreichend gebildet werden [173]. Für Weizenpflanzen beispielsweise wurde eine geringe PS-Abscheidung aus den Wurzeln unter Stickstoffmangel berichtet [173]. Aciksoz et al. erklärten diese Verringerung mit verringerter Biosynthese.

Auffällig war außerdem, dass trotz der hohen Komplex-Gehalte in den zwei Probengruppen weder in diesen noch in den anderen Gruppen nennenswerte Signale freier (unkomplexierter) PS zu messen waren. Es ist denkbar, dass die PS nicht in den untersuchten Blättern gebildet, sondern in Form der Metall-Komplexe in die Blätter transportiert werden.

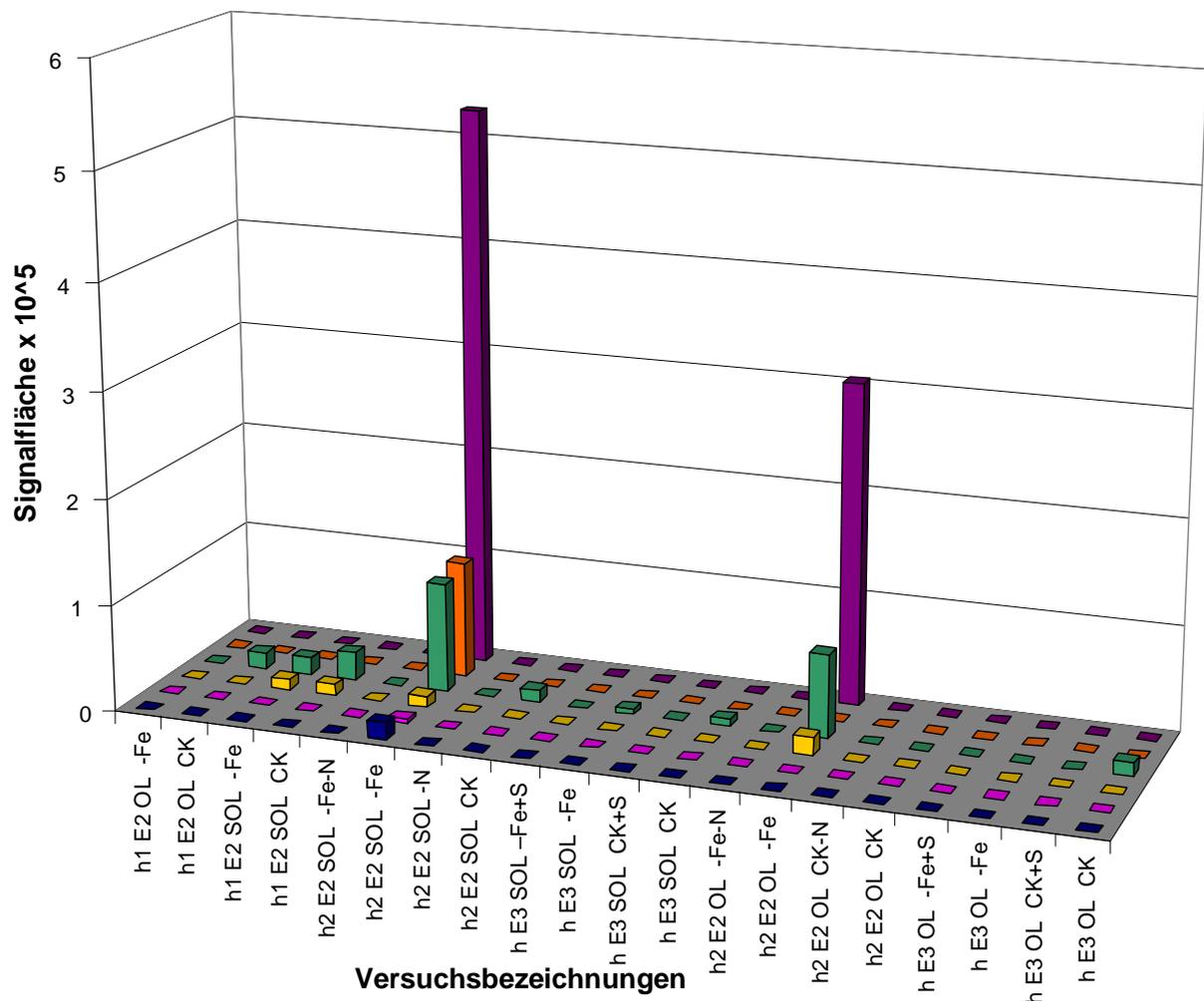


Abbildung 64: Mugineinsäurekomplexe mit verschiedenen Metallen in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.43; blau: MA, violett: MA-Ni, gelb: MA-Cu, grün: MA-Zn, orange: MA-Mn(II), lila: MA-Fe(III); Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O

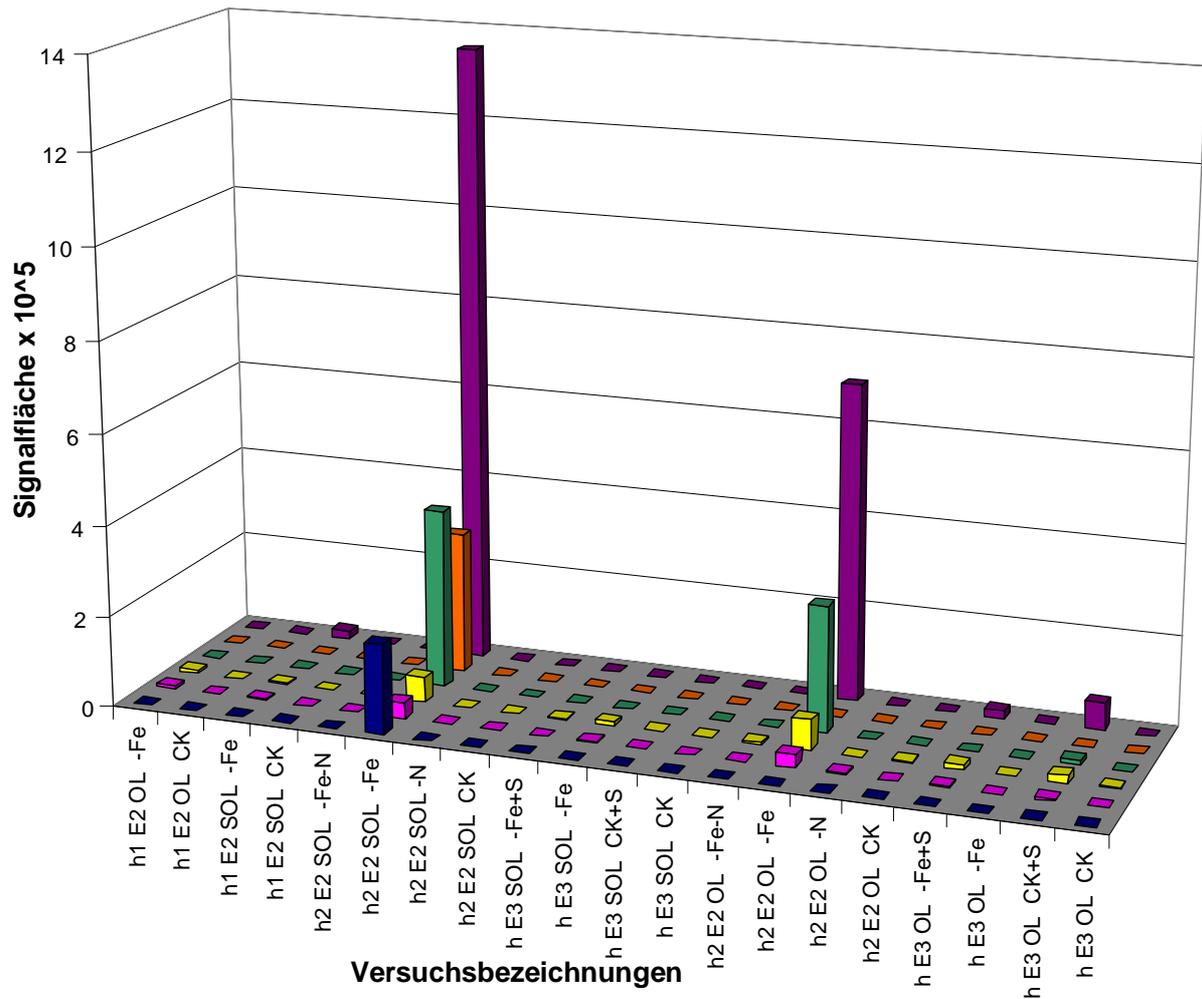


Abbildung 65: 2'-Deoxymugineinsäure und DMA-Komplexe mit verschiedenen Metallen in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.43; blau: DMA, violett: DMA-Ni, gelb: DMA-Cu, grün: DMA-Zn, orange: DMA-Mn(II), lila: DMA-Fe(III); Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O

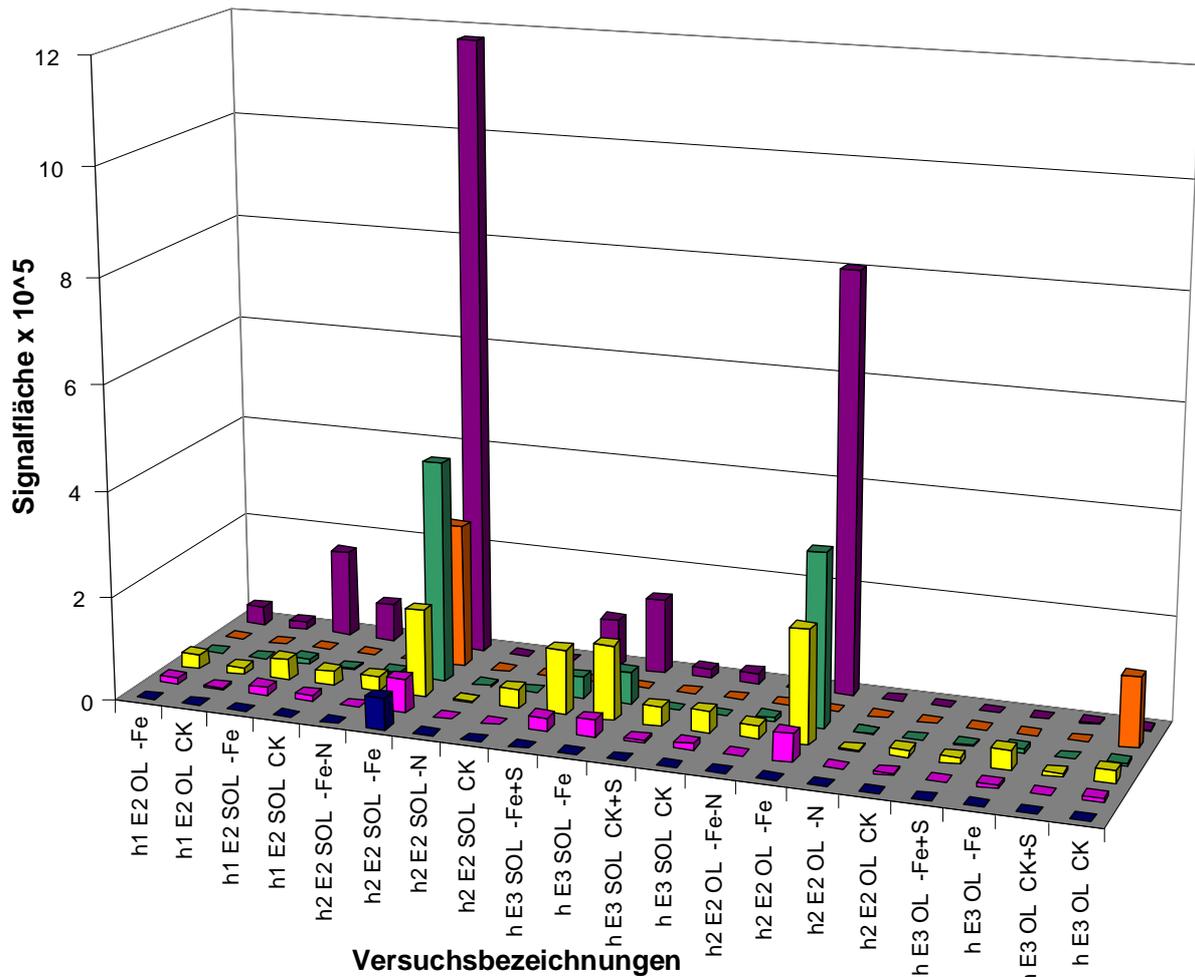


Abbildung 66: Hydroxymugineinsäure und HMA-Komplexe mit verschiedenen Metallen in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung Tabelle 1, S.43; blau: HMA, violett: HMA-Ni, gelb: HMA-Cu, grün: HMA-Zn, orange: HMA-Mn(II), lila: HMA-Fe(III); Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O

Die Auswertung der NA-Komplexe (Abbildung 67) zeigte keine so klare Verteilung wie die Phytosiderophorkomplexe. In fast allen Proben wurde Cu-NA nachgewiesen; die Komplexe mit anderen Metallen wurden nur in einzelnen Proben in überwiegend geringen Gehalten nachgewiesen. Auch freies NA war ebenfalls nur in einzelnen Proben detektierbar. Auffällig waren die Messungen der beschatteten ältesten Blätter aus Experiment 3 (h E3 OL -Fe+S; h E3 OL CK+S). In ihnen wurde deutlich mehr Cu-NA detektiert als in den Vergleichsproben und gleichzeitig wurde nur in diesen Blättern Zn-NA detektiert.

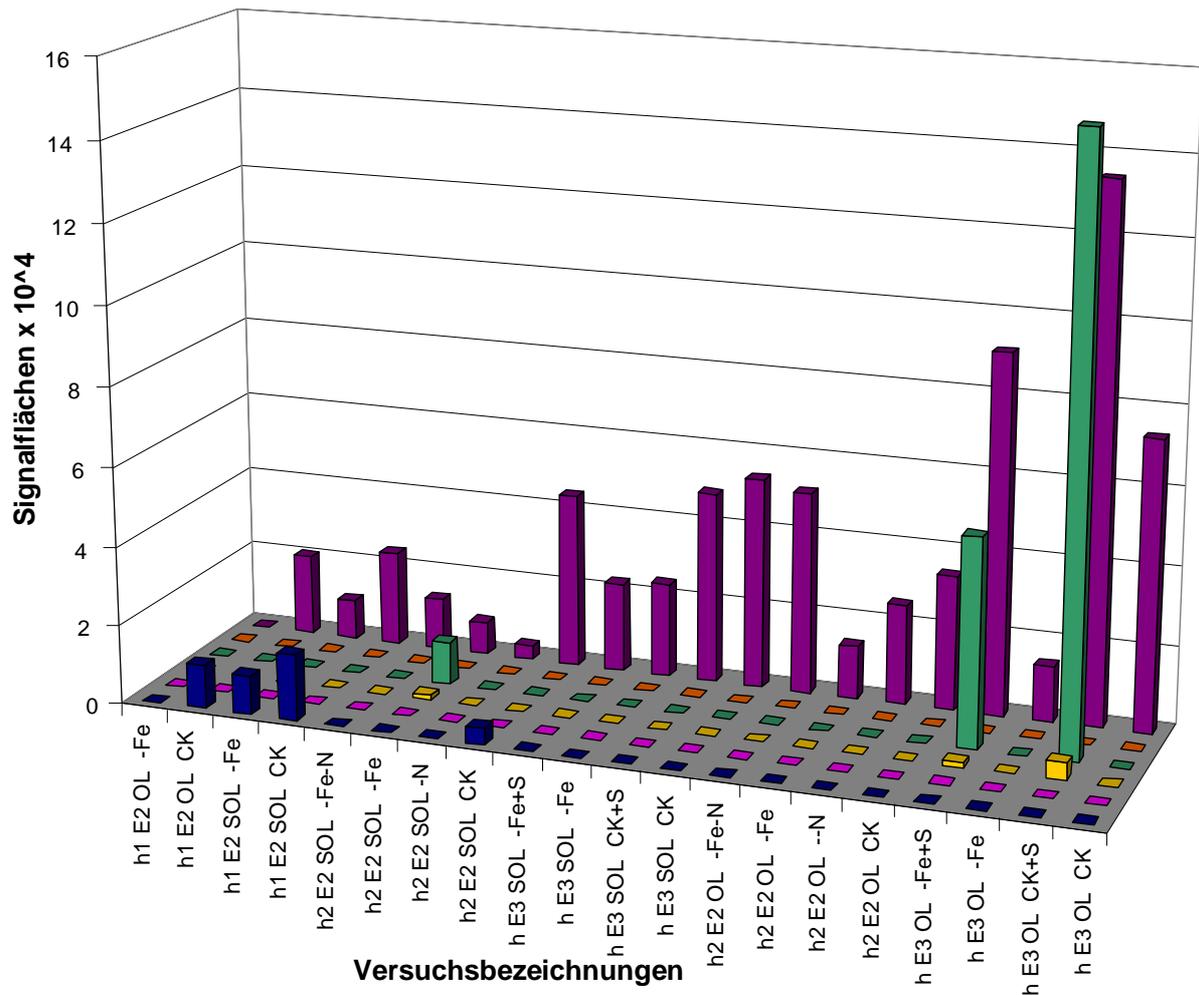


Abbildung 67: Nicotianamin und NA-Komplexe mit verschiedenen Metallen in Gerste mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1, S.43; blau: NA, violett: NA-Fe(III), gelb: NA-Ni, grün: NA-Zn, orange: NA-Mn(II), lila: NA-Cu; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass in Gerstenblättern Phytosiderophor-Metall-Komplexe vorkommen. Bisher wurde die Biosynthese und das Vorkommen von Phytosiderophoren hauptsächlich in der Wurzel nachgewiesen [176-177]. Nur in wenigen Arbeiten wurde über die Biosynthese von Phytosiderophoren in Blättern, vor allem unter Eisenmangel, berichtet [173]. Bisher wurden Phytosiderophore hauptsächlich im Zusammenhang mit der Eisenaufnahme in die Pflanze gesehen.

Es wurden Metallkomplexe mit drei unterschiedlichen Phytosiderophoren in der untersuchten Gerstesorte nachgewiesen. Die PS stimmten mit den in Gerste zu erwartenden überein. Es ist bekannt, dass in den Wurzeln von Gerste DMA, MA und

epi-HMA produziert werden können [176]. Auffällig ist, dass neben den Metallkomplexen fast keine freien PS detektiert wurden.

Trotz ihrer unterschiedlichen thermodynamischen Stabilität wurden Metall-PS- und Eisen-Citrat-Komplexe nebeneinander in den Proben bestimmt. Die Befürchtung, dass es bei einer derartigen Probenzusammensetzung zu Austauschreaktionen kommen könnte, hat sich somit nicht bewahrheitet. Austauschreaktionen sind komplexe Reaktionen, deren genauer Mechanismus bisher nicht bekannt ist. Die Aufarbeitung wurde im Hinblick darauf minimiert und so die Wahrscheinlichkeit dieser Reaktionen verringert. Dass die Strategie erfolgreich war, wurde in den Wiederholungsmessungen gezeigt. Falls in einem Zeitraum von einigen Stunden Austauschreaktionen in messbarem Ausmaß stattgefunden hätten, wären die Veränderungen in den Proben bereits während der vierfachen Messung einzelner Proben (180 min Mesdauer) sichtbar geworden. Die Wiederholbarkeit wurde nachgewiesen und gezeigt, dass thermodynamische Faktoren das eingestellte Gleichgewicht in der Probe nicht verändern.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Methode einen umfassenden Überblick über die bekannten niedermolekularen Metallspezies bietet und damit die Bearbeitung biologischer Fragestellungen zu Metalltransportprozessen ermöglicht.

Die Ergebnisse für die Eisenmangel-Proben deuten darauf hin, dass durch den Eisenmangel wie erwartet Eisen aus den älteren Blättern remobilisiert wurde. Ein direkter Einfluss der zwei verschiedenen Seneszenzauslöser war hier nicht festzustellen.

6.3.3 Identifizierung von bisher unbekanntem Metaboliten zur Unterscheidung der Ernährungszustände

Um die Auswirkung verschiedener Ernährungszustände auf die Metaboliten einer Pflanzenart festzustellen, ist eine Analyse der LC-MS-Datensätze über die bekannten Analyten hinaus erforderlich. Dabei ist es sinnvoll, nicht nur bekannte Analyte wie die Eisen-Citrate und Kupfer-Histidine zu untersuchen, sondern auch unbekannte Metabolite zu identifizieren, deren systematische Betrachtung zur weiteren Aufklärung der Metallgleichgewichte beitragen kann. Dazu eignen sich softwaregestützte Ansätze. MZmine ist ein Software-Tool, mit dem u. a. eine

Rohdatenauswertung ohne Vorgaben (non-targeted) durchgeführt werden kann [106-109] (s. Kapitel 4.5).

Mit Hilfe der MZmine-Software erfolgte eine Auswertung der Datensätze der Gerstenpflanzen, die in mehreren Versuchen unter verschiedenen Ernährungsbedingungen (Seneszenz durch Beschattung/Stickstoffmangel, kombiniert mit Eisenmangel) angezogen wurden.

Die Datenanalyse gliederte sich in folgende Punkte:

- I) Rohdatenimport und Verarbeitung
- II) Peakdetektion (Erstellung von Peaklisten)
- III) Datenvergleich
- IV) Visualisierung (PCA, Scatterplots)

Bei der Auswertung der Rohdaten wurden die fünf biologischen Replikate als Gruppe verwendet. Als Vergleichsgruppen wurden die unterschiedlichen Ernährungszustände des gleichen Versuches (d. h. gleicher Pflanzenteil) verwendet. Die Grundlage der Rohdatenauswertung mit der MZmine-Software, die Erkennung chromatographischer Signale, erfolgte nach festgelegten Parametern (Kapitel 4.5), die eine vollständige Erfassung der Peaks und gleichzeitig einen Ausschluss von Untergrundrauschen als vorgetäuschte Signale ermöglichten (> 80 % korrekte Signale). Die dabei erstellten Probenlisten umfassen mehr als 1000 Signale für jeden Massenbereich.

Streudiagramme:

Für den direkten Vergleich zweier Gruppen wurden Streudiagramme herangezogen. Streudiagramme stellen die Abweichung einzelner Signale in den verglichenen Proben dar. Dabei wird die Signalfäche der unterschiedlichen Proben in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt, bei dem eine der Proben die x-Achse und eine der anderen die y-Achse darstellt. Die Abweichung von der Diagonalen ist das Maß für den Unterschied der Proben.

Es wurden ausschließlich Signale berücksichtigt, die in mindestens 5 Proben (also der gesamten Gruppe) zu finden sind. Diese Vorauswahl ermöglicht das Auffinden von spezifischen Signalen, die sich zwischen den verglichenen Probengruppen deutlich unterscheiden. Diese Signale sind dann erfolgversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen und Identifizierungen.

Zunächst wurden Proben einer Gruppe miteinander verglichen. Dabei befanden sich die Signale zu >90 % innerhalb einer Abweichung von 2. Das ist ein typisches Ergebnis für zwei ähnliche Proben.

Beim Vergleich der verschiedenen Ernährungszustände miteinander waren <60 % der Signale im 2-Bereich zu finden. Dies zeigt große Unterschiede in den detektierten Metabolitgehalten. Abbildung 68 zeigt das am Vergleich zwischen der Auftragung der Replikate gegeneinander und der Auftragung des Eisenmangelzustandes (-Fe) gegen die Kontrolle (h2E2OL, Massenbereich I, 65-175 m/z).

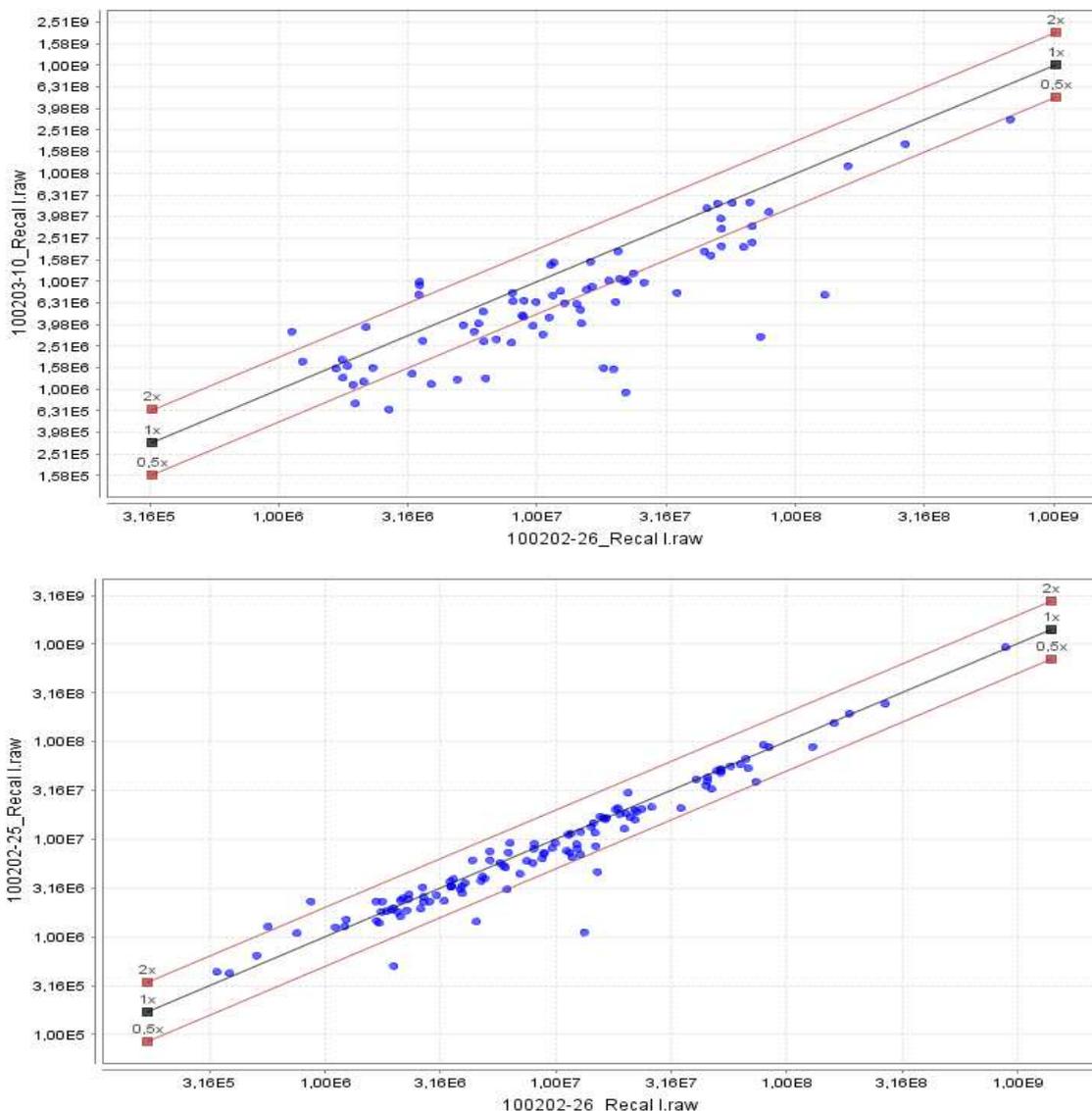


Abbildung 68: Scatterplots, Vergleich -Fe mit CK (h2E2OL, Massenbereich I) Diagramm oben; Vergleich der Replikate CK (h2E2OL, Massenbereich I)

Auch für den mittleren Massenbereich lassen sich die Tendenzen bestätigen. Abbildung 69 zeigt für das zweitälteste Blatt das Streudiagramm für den Vergleich des Eisenmangelzustandes mit der zugehörigen Kontrolle (h2E2SOL, Massenbereich II).

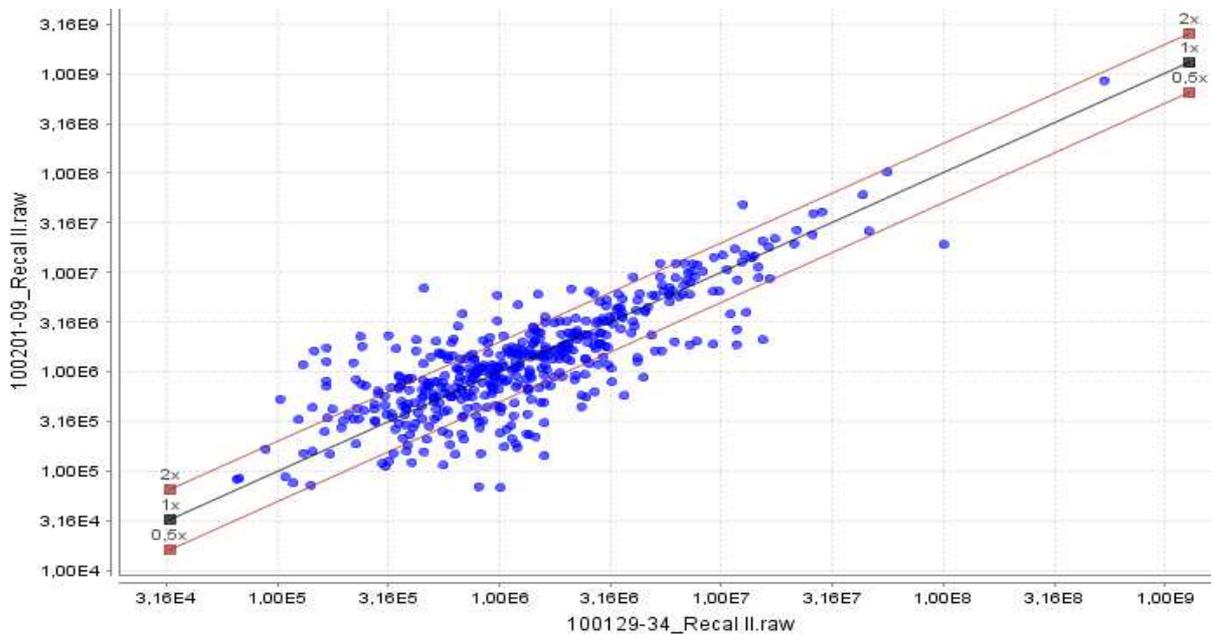


Abbildung 69: Streudiagramm für den Vergleich des Eisenmangelzustandes (-Fe) mit der dazugehörigen Kontrolle (CK) aus Versuch h2E2SOL; untersuchter Massenbereich II (150-500)

Aus den Streudiagrammen lassen sich die chromatographischen Signale identifizieren, die die größte Abweichung beinhalten und so auffällig für den Ernährungszustand sind. Diese Substanzen, die durch Retentionszeit und m/z-Verhältnis charakterisiert sind, können aussichtsreiche Kandidaten und ein Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein.

Bei der Untersuchung des innerpflanzlichen Metalltransportes sind potentielle Liganden im Fokus des Interesses, genauso wie Metaboliten, die über bestimmte bekannte Kreisläufe mit Liganden im Zusammenhang stehen. In Abbildung 70 sind einige Kandidaten gezeigt, die bei der Auswertung der Scatterplots im Vergleich zu den Kontrollpflanzen hervorstachen.

Dabei fielen vor allem die Metaboliten des Citratzyklus auf (Brenztraubensäure, Bernsteinäure, Fumarsäure und Aconitsäure) sowie Aminosäuren (hauptsächlich Glutamin) und Metaboliten der Glycolyse (Milchsäure). Diese Substanzen kommen,

abhängig vom Ernährungszustand, in veränderten Gehalten vor. Die hier hervorstechenden Gruppen sind im Einklang mit den Substanzen, für die in der Literatur bereits Veränderungen bei Eisenmangel von Tomate, Lupine und Pfirsich berichtet wurden [169].

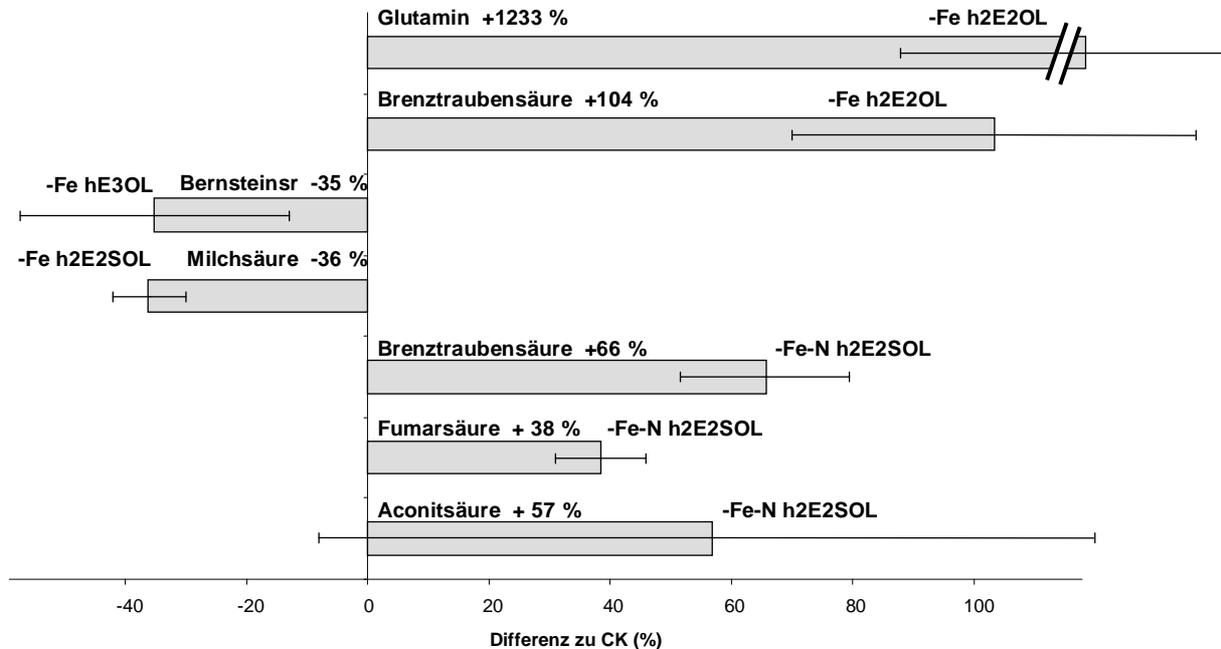


Abbildung 70: Auffällig abweichende Signale in der Auswertung der Streudiagramme -Fe / -Fe-N im Vergleich mit der zugehörigen Kontrolle, Abweichung in Prozent der Signalfäche

Ein weiteres Beispiel für Substanzen deren Gehalte in den verglichenen Gruppen stark voneinander abweichen ist das α -Ketoglutarat (Identifizierung s. Kapitel 6.3.3). Im Chromatogramm der zehn miteinander verglichenen Proben (Abbildung 71) ist sehr deutlich zu sehen, dass die fünf Proben der Pflanzen mit Stickstoffmangel im Vergleich zur Kontrolle einen deutlich erhöhten Gehalt an α -Ketoglutarat aufweisen. Auch das α -Ketoglutarat kommt im Citratzyklus vor, dessen Metaboliten besonders stark durch die unterschiedlichen Ernährungszustände und die Seneszenz beeinflusst sind. Interessanterweise wurde noch ein weiterer Peak mit gleichem m/z gefunden, der später als β -Ketoglutarat identifiziert wurde (s. Kapitel 6.3.3). Das isomere β -Ketoglutarat zeigt die Unterschiede nicht, da es durch anderweitige Zersetzungs-Reaktionen aus Citrat entsteht.

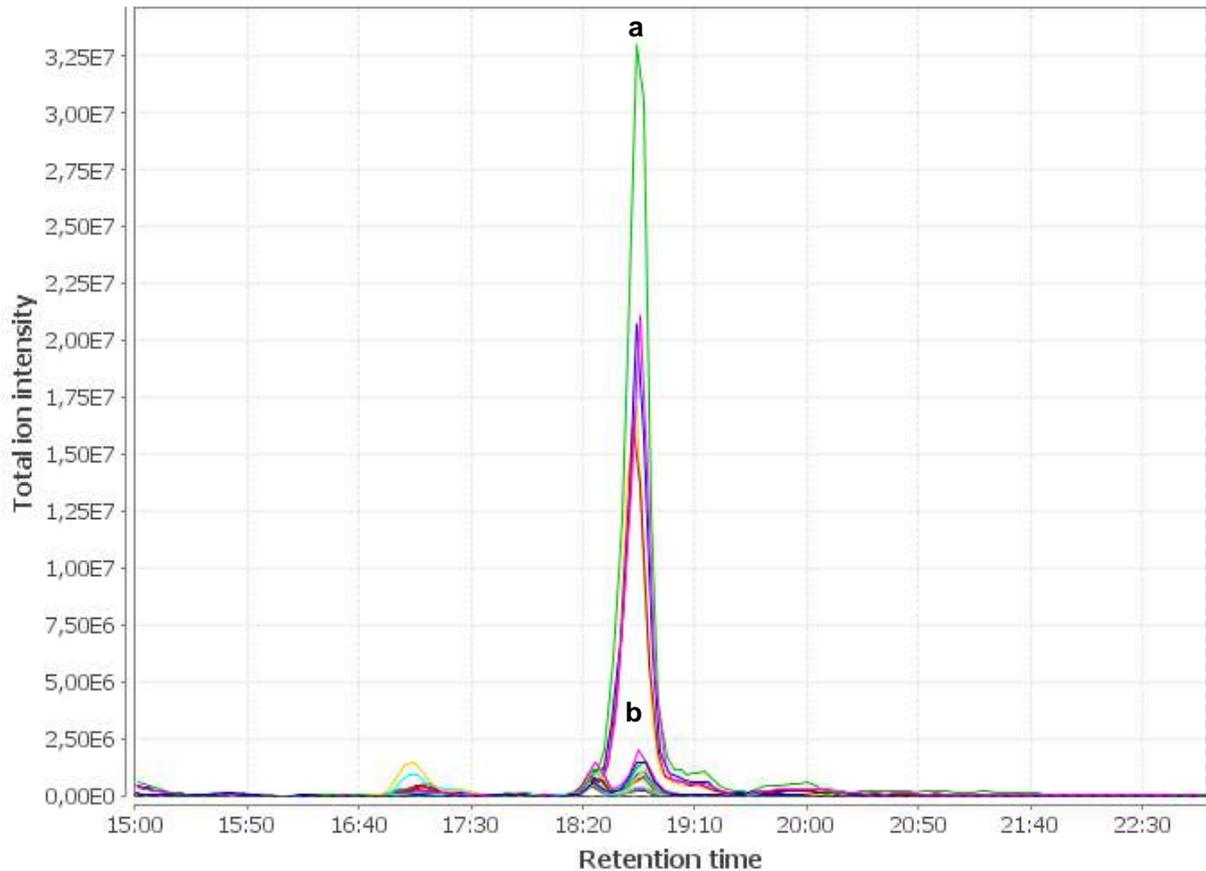


Abbildung 71: α -Ketoglutarat in den Proben aus Experiment 2 (h2E2SOL), die Proben (a) mit Seneszenz durch Stickstoffmangel (-N) zeigen einen deutlich erhöhten Gehalt an α -Ketoglutarat als die Kontrollen (b)

Mit Hilfe der MZmine-Software wurden Substanzen entdeckt und identifiziert, die sich in den Gruppen unterscheiden und daher ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sind. Es konnten charakteristische Gruppen identifiziert werden, die starken Veränderungen durch Eisenmangel und Seneszenz unterliegen. Besonders auffällig waren dabei die Metaboliten des Citratzyklus und Aminosäuren. Beide Gruppen sind potentielle Liganden für Metalle bzw. sind über den Citratzyklus durch Gehaltsänderungen von Liganden betroffen. Es ist schwierig, einzelne Metabolisierungswege abzutrennen, daher werden bei der Betrachtung der Ernährungs- und Seneszenz-Zustände die gesamten Gruppen analysiert.

Analyse der Metaboliten des Citratzyklus

Die Trends, die die Gehaltsänderungen der Citratzyklus-Metaboliten abhängig vom Ernährungszustand zeigen und wie sie sich in den oben dargestellten MZmine-Untersuchungen andeuteten, sind analog zu Untersuchungen an Strategie-I-

Pflanzen. Es wurde festgestellt, dass Strategie-I-Pflanzen unter Eisenmangelzuständen ebenfalls stark erhöhte Gehalte der Metaboliten des Citratzyklus zeigten [169]. Für Strategie-II-Pflanzen fehlen vergleichbare Informationen. Um die Zusammenhänge der Gehalte mit dem Ernährungszustand und der Seneszenz detailliert zu beurteilen, wurden die Metaboliten des Citratzyklus im Folgenden ausgewertet.

Bei den in Tabelle 10 aufgeführten Substanzen handelt es sich um die in verschiedenen Stufen des Citratzyklus vorkommenden Metaboliten. Diese wurden bei der Messung mit der vorliegenden Methode erfasst und zur Auswertung herangezogen.

Tabelle 10: Metaboliten des Citratzyklus (m/z kalkuliert mit Xcalibur)

Metabolit	Summenformel [M-H]⁻	m/z [M-H]⁻
Citrat	C ₆ H ₇ O ₇ ⁻	191,01973
Isocitrat	C ₆ H ₇ O ₇ ⁻	191,01973
α-Ketoglutarat	C ₅ H ₅ O ₅ ⁻	145,01425
Succinat	C ₄ H ₅ O ₄ ⁻	117,01933
Fumarat	C ₄ H ₃ O ₄ ⁻	115,00368
Malat	C ₄ H ₆ O ₅ ⁻	133,01425
Oxalacetat	C ₄ H ₃ O ₅ ⁻	130,99860

Da für einige dieser Metaboliten mehrere Isomere mit gleicher Summenformel existieren, müssen diese anhand ihrer Retentionsreihenfolge unterschieden werden. Dies gilt vor allem für das Citrat und Isocitrat, das Isomerenpaar mit m/z=191,0197, die beide im Citratzyklus vorkommen. Die Zuordnung wurde mit Hilfe von Standards durchgeführt. Darüber hinaus wurden für einige andere Verbindungen mehrere Signale im gleichen m/z gemessen.

Die Zuordnung möglicher Verbindungen wurde mithilfe der frei im Internet verfügbaren Online-Datenbank KEGG-Ligand-Database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/> or <http://www.kegg.jp/> [178]) selektiert und deren Elutionsverhalten auf der Zic-HILIC-Säule mit dem ebenfalls frei erhältlichen „Retention Prediction Tool“ für HILIC von Sequant simuliert.

Für das Isomerenpaar mit $m/z=145,01425$ wurden zwei Signale gemessen. Eines davon entspricht dem α -Ketoglutarat, das ein Bestandteil des Citratzyklus ist und damit in allen Pflanzen vorhanden sein sollte. Bei dem zweiten Isomer handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um das β -Ketoglutarat. Dieses kommt natürlicherweise nicht in Pflanzen vor, entsteht jedoch in einer Reaktion von Citrat und Fe(III), z.B. auch bei der Zersetzung von Eisen-Citrat-Komplexen [179]. Für das α -Ketoglutarat wurde bei den Analysen ein Standard gemessen, so dass man in diesem Fall das zweite Signal (18,5 min) eindeutig dem α -Ketoglutarat und das erste Signal der β -Form zuordnen kann. Diese Zuordnung passt zu der Reihenfolge, die das Retention-Prediction-Tool vorhersagt. Um die Identifizierung des β -Ketoglutarates abzusichern und andere isomere Verbindungen auszuschließen, wurde neben dem m/z die MS^2 -Auswertung verwendet (Abbildung 72). Hier ist zu sehen, dass die resultierende Massenverteilung im MS^2 für beide Signale ein einzelnes Hauptfragment aufweist. Dabei handelt es sich um ein Fragment mit $m/z=101,0$, was der Masse von Ketoglutarat mit Verlust eines Moleküls CO_2 entspricht. Die Übereinstimmung in der Fragmentierung weist darauf hin, dass es sich bei den chromatographischen Signalen um Substanzen mit sehr ähnlicher molekularer Struktur handelt, was gut zu α - und β -Ketoglutarat passt und damit die Identifizierung untermauert.

Bei der Trennung fällt auf, dass die zwei Signale sehr unterschiedlich sind. Das Signal bei 9,7 min eluiert über 3 min, mit starkem Tailing ($T = 0,3$), wohingegen das zweite Signal, bei 18,5 min, in ca. 0,6 min eluiert und sehr symmetrisch ist ($T = 1$). Das könnte ein Hinweis sein, dass das β -Ketoglutarat vor der Trennung in komplexierter Form vorgelegen hat und daher ein anderes Trennverhalten aufweist, v. a. falls es sich dabei um nicht klar definierte Stöchiometrien handelt.

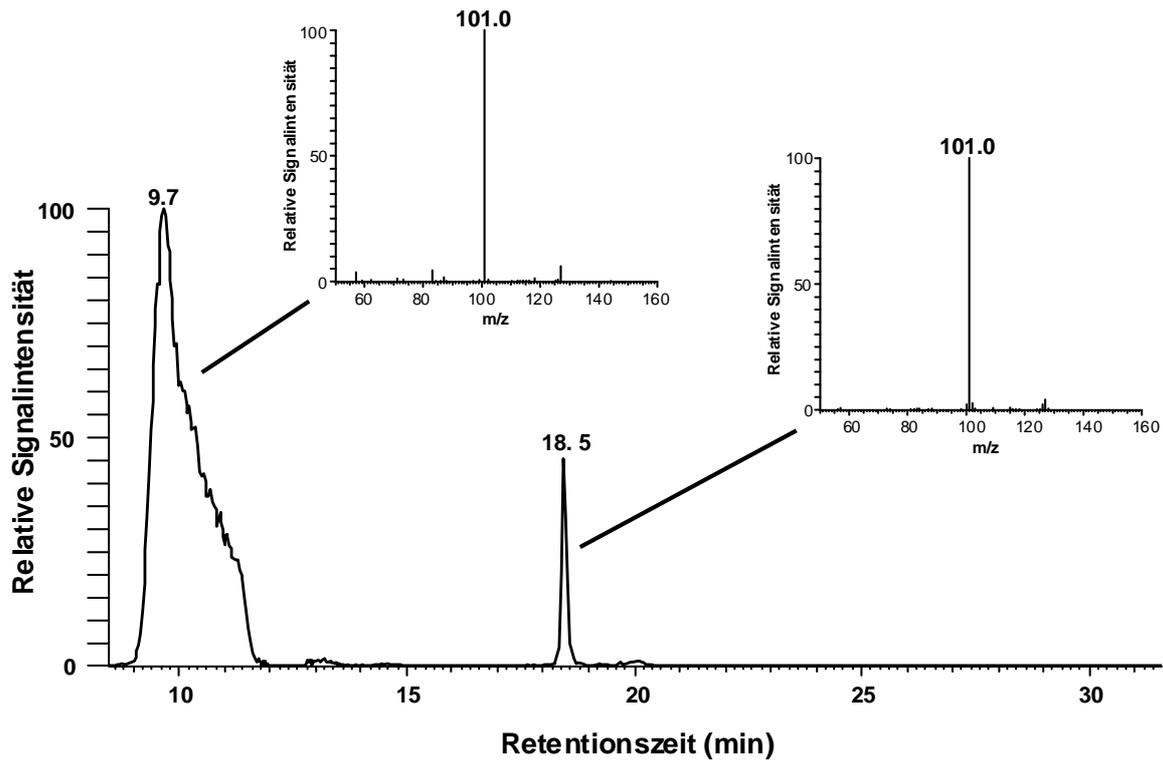


Abbildung 72: Chromatographische Trennung zweier Signale mit $m/z=145,01425$; die Fragmentierung im MS^2 -der einzelnen Signale stimmt gut überein und unterstützt die Zuordnung der Signale zu β - (9,7 min) und α -Ketoglutarat (18,5 min)

Auf ähnliche Art und Weise wurde auch das Isomerenpaar mit $m/z=130,99860$ zugeordnet, bei dem neben dem Oxalacetat das 2-Hydroxyethylendicarboxylat detektiert wurde, das durch Oxalacetat-Keto-Enol-Isomerase aus Oxalacetat entsteht und eine Rolle im Pyruvat-Metabolismus spielt. Das 2-Hydroxyethylendicarboxylat eluiert laut Kalkulationssoftware dabei nach dem Oxalacetat. Die gemessenen Isomere lassen sich somit logisch zuordnen.

Abbildung 73 zeigt an vier repräsentativen Beispielen, dass in den durchgeführten Versuchen signifikante Unterschiede für die Metaboliten des Citratzyklus sichtbar sind. Bei den abgebildeten Standardabweichungen handelt es sich um die Abweichungen innerhalb der fünf hergestellten biologischen Replikate.

Die in Abbildung 73 dargestellten Beispiele entstammen dem Stickstoffmangel-Seneszenz-Experiment (Experiment 2). Es sind die Fumarat-Gehalte (A: $m/z=115,0036$) und Isocitrat-Gehalte (B: $m/z=191,0197$) für das zweitälteste Blatt und die α -Ketoglutarat-Gehalte (C: $m/z=145,0142$) und Citrat-Gehalte (D:

m/z=191,0197) für das älteste Blatt dargestellt. In allen vier Beispielen unterscheiden sich die vier Zustände innerhalb des Versuches deutlich.

Dabei kann man gut sehen, dass die Pflanzen unter Eisenmangel einen höheren Gehalt an Citrat aufwiesen als die Kontrollpflanzen (Abbildung 73, D). Die seneszenten Pflanzen (durch Stickstoffmangel) unter Eisenmangel wiesen mehr Citrat auf als die nicht seneszenten. Diese Verteilung entspricht den Gehalten an Eisen-Citrat, wie sie im oberen Abschnitt dargestellt wurden (Abbildung 62). Das lässt darauf schließen, dass der erhöhte Citratgehalt wie erwartet über den Eisenmangel, bzw. die Seneszenz gesteuert wird [168-169]

Die über den Citratzyklus mit dem Citrat verbundenen Metaboliten zeigen ebenfalls deutliche Gehaltsänderungen. Eine Übersicht über sämtliche zu dieser Gruppe gehörenden Metaboliten und deren Isomere ist in Abbildung 74 zu finden.

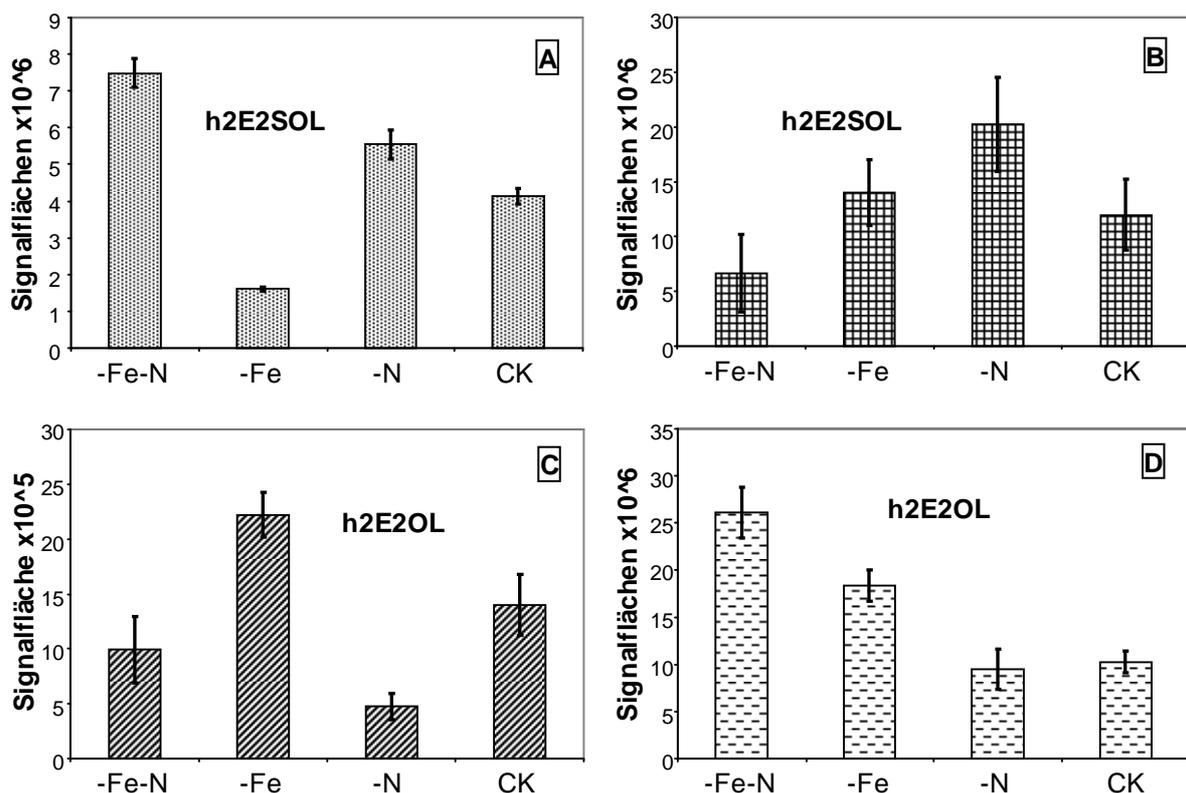


Abbildung 73: Metaboliten des Citratzyklus und isomere Verbindungen, ausgewählte m/z im Vergleich der unterschiedlichen Ernährungszustände, Standardabweichungen der biologischen Replikate; A: Fumarat (m/z=115,0036); B: Isocitrat (m/z=191,0197); C: α-Ketoglutarat (m/z=145,0142); D: Citrat (m/z=191,0197)

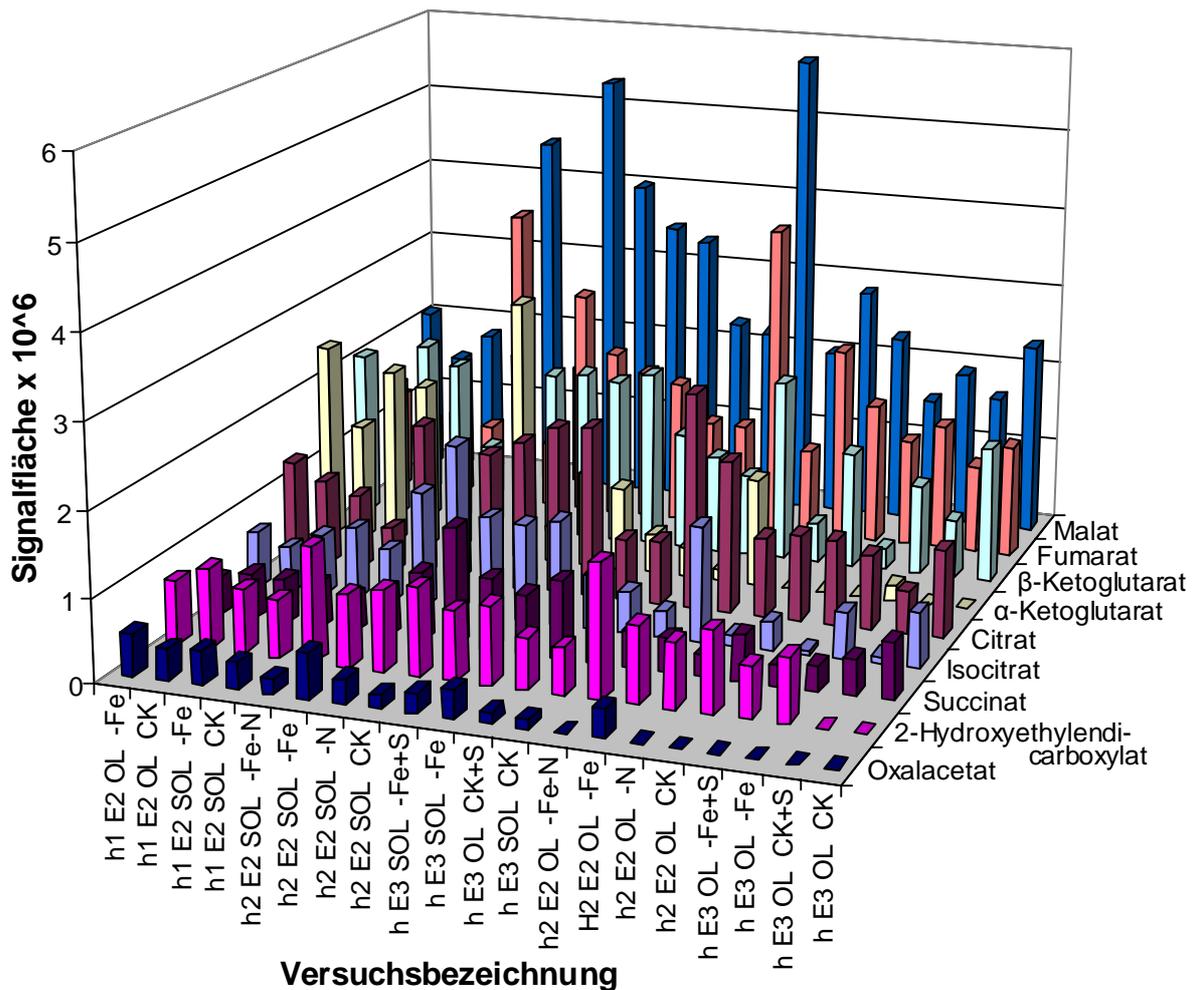


Abbildung 74: Gesamtübersicht über die mit dem Citratzyklus zusammenhängenden Metaboliten (inklusive isomeren Signale), x-Achse: Versuchsnummern; y-Achse: m/z-Verhältnisse; Die detaillierten Auswertungen der einzelnen Metaboliten mit Standardabweichungen finden sich im Anhang

Aminosäuren

Neben den Metaboliten des Citratzyklus wurden für einige Aminosäuren stark veränderte Gehalte in der Auswertung der Scatterplots mit MZmine festgestellt (Kapitel 6.3.3). Da Aminosäuren bekanntermaßen als potentielle Liganden für Metalle fungieren (Kupfer-Histidin), ist die Abhängigkeit der Gehalte vom Ernährungszustand von großem Interesse. Aus diesem Grund wurde für die hier untersuchte Probenreihe ein umfassender Überblick über die proteinogenen Aminosäuren erstellt. Einen Gesamtüberblick bietet dabei Abbildung 75.

Eine detaillierte Aufstellung der Auswertungen inklusive der zugehörigen Standardabweichungen ist im Anhang abgebildet. Auch hier wurden Mittelwerte aus fünf biologischen Replikaten dargestellt.

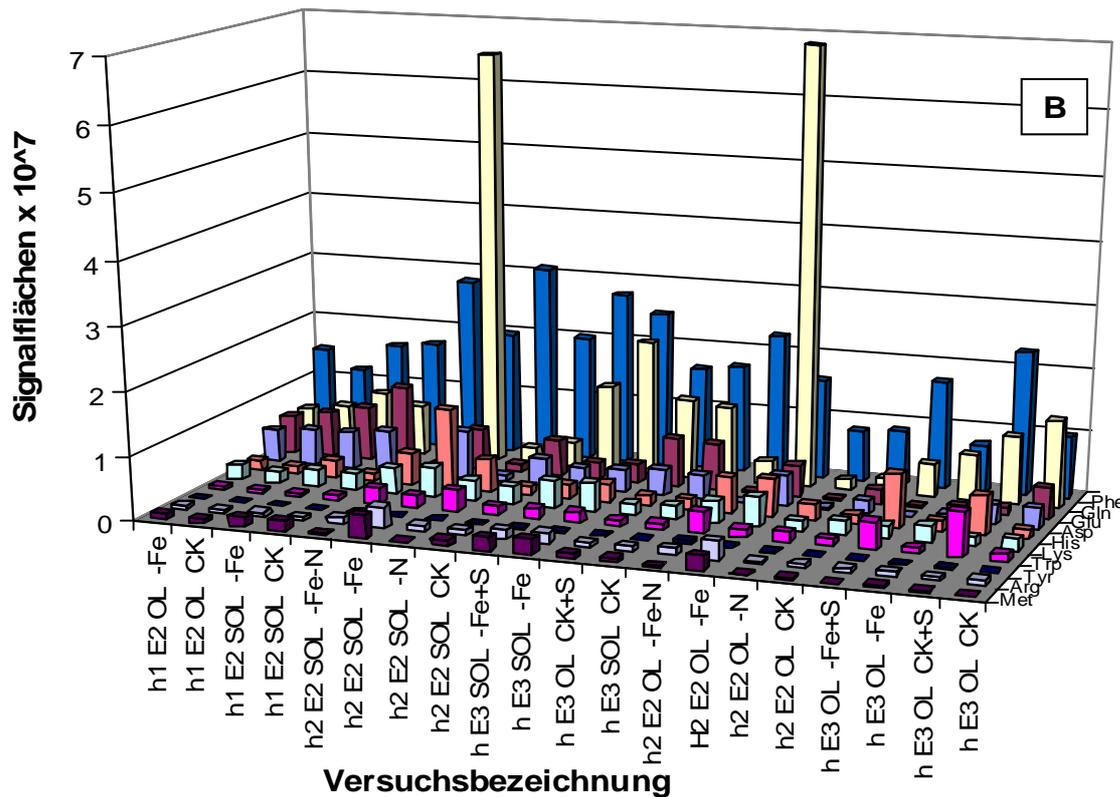
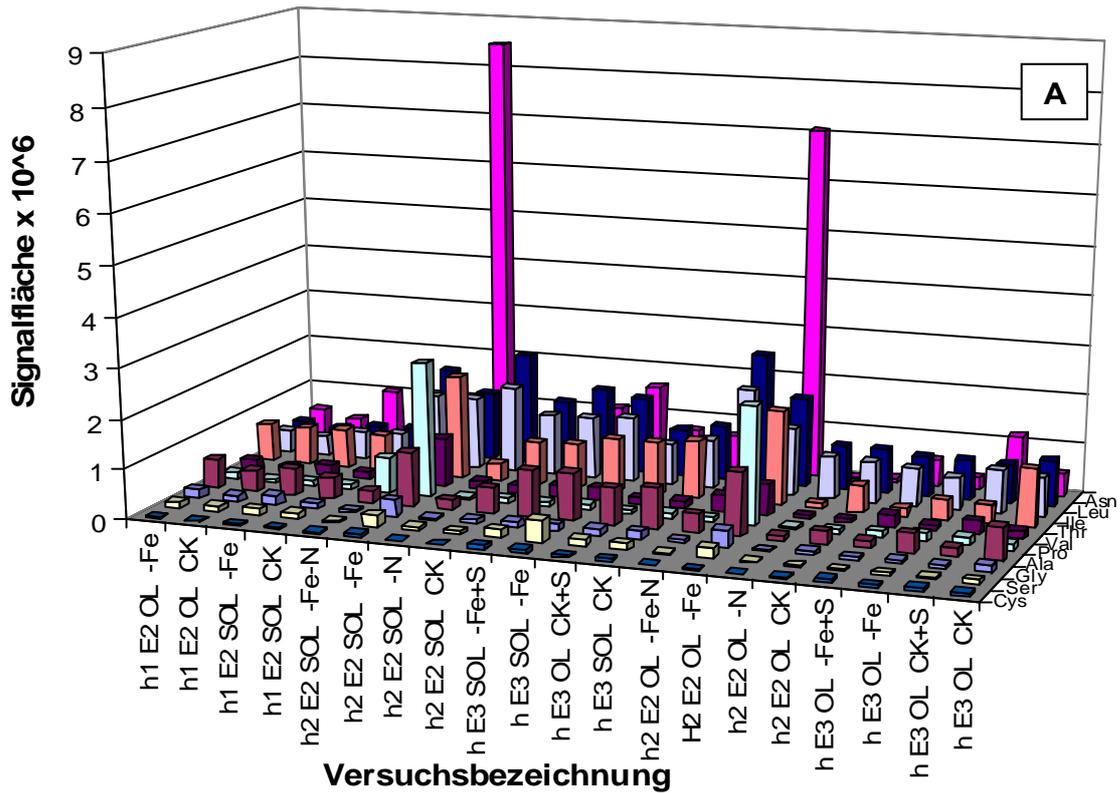


Abbildung 75: Gesamtübersicht über Aminosäuren in Gerstepflanzen mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Experimentplanung s. Tabelle 1; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfbetaïnphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O; Die Auswertung der einzelnen Aminosäuren mit Standardabweichungen finden sich im Anhang

Bei der Auswertung der Aminosäurenverteilung fallen zwei Proben auf, die auffällig hohe Asparagin- und Glutamingehalte aufweisen (Abbildung 76). Auch die Gehalte von Arginin, Methionin, Threonin, Valin, Prolin und Glycin sind in diesen zwei Proben stark erhöht. Bei diesen zwei auffälligen Proben handelt es sich um die gleichen Eisenmangel-Proben, die bereits bei der Auswertung der PS-Komplexe extrem hohe Gehalte der Metall-Komplexe aufwiesen. Bei den Proben handelt es sich um das älteste und das zweitälteste Blatt von unter Eisenmangel gewachsenen Pflanzen in Experiment 2.

Für die Wurzelexsudate von Mais und Gerste ist seit längerem bekannt, dass unter Eisenmangel die Gehalte vieler Aminosäuren ansteigen [180-181]. Für die Blätter von Strategie-I-Pflanzen wie Tomate und Lupine wurden unter Eisenmangel eine Abnahme der Aminosäuregehalte berichtet [169]. In Zuckerrübenblättern wurde eine Zunahme des AS-Gesamtgehaltes in der Apoplastenflüssigkeit und im Xylem gemessen, die jedoch auf wenige einzelne ASen zurückzuführen war, während die meisten AS-Gehalte unter Eisenmangel zurückgingen [32]. Die Gründe für die Gehaltsänderungen sind bisher nicht vollständig geklärt. Es konnten keine systematischen Untersuchungen zu AS-Gehalten in Blättern von Strategie-II-Pflanzen unter Eisenmangel in der Literatur gefunden werden.

Da es sich bei der Probenserie um einen Teil eines größeren Projektes handelt, sind vollständige Auswertungen und gesicherte Aussagen über biologische Zusammenhänge hier nicht möglich und auch nicht Ziel dieser Arbeit. Die Ergebnisse bestätigen jedoch die Annahme, dass unterschiedliche Ernährungszustände wie z. B. Eisenmangel nicht nur Auswirkungen auf Gehalte von direkt beteiligten (und nachgewiesenen) Metaboliten wie z.B. Phytosiderophoren haben. Stattdessen wurden auch Zusammenhänge mit anderen Metaboliten deutlich, deren Einfluss nicht auf den ersten Blick zu erwarten war.

Diese bisher ungeklärten Zusammenhänge können als Ansatzpunkt für weitere biologische Versuche dienen.

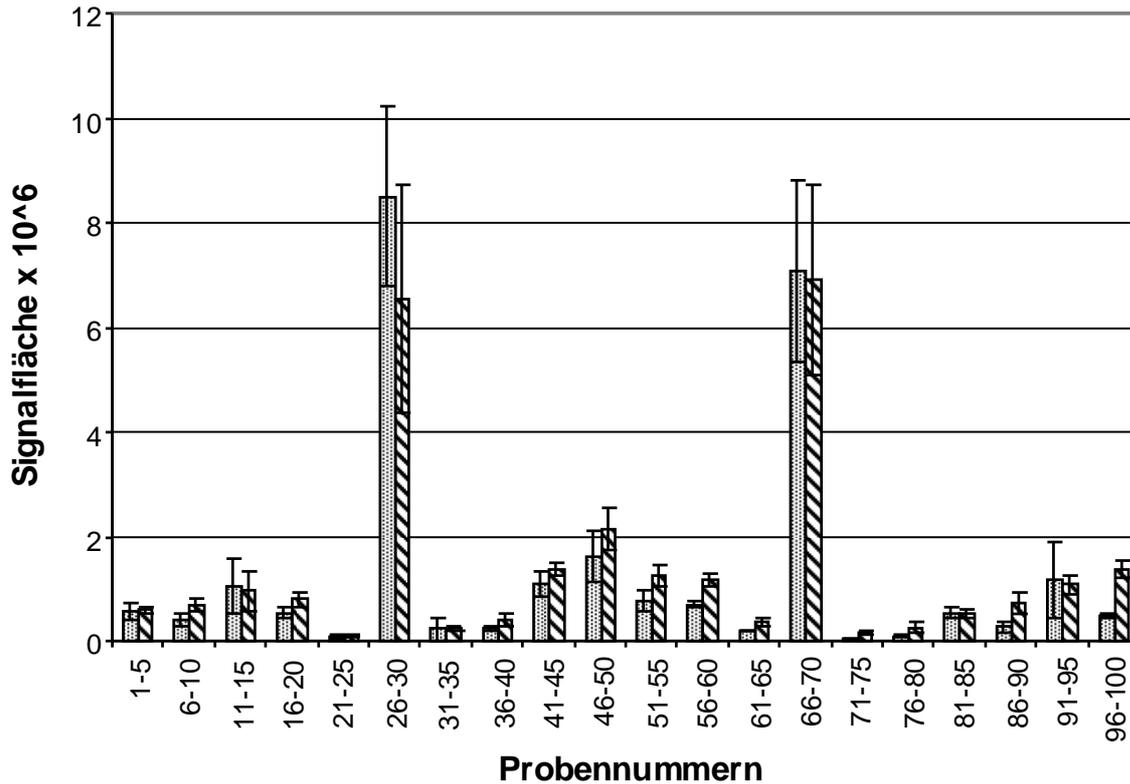


Abbildung 76: Aminosäuren in Gerstenpflanzen mit unterschiedlichen Ernährungszuständen; Asparagin (gepunktet) und Glutamin (gestreift); Experimentplanung s. Tabelle 1; Trennung auf einer zwitterionischen Sulfobetainphase (Zic HILIC), Trennbedingungen: pH 5,5; Gradientenelution 95:5 ACN/H₂O bis 45:55 ACN/H₂O

In der Untersuchung wurde die Anwendbarkeit der entwickelten Analysenmethode für eine komplexe biologische Fragestellung nachgewiesen. Neben der Analyse der labilen Metallspezies gelang es, stabile Metallkomplexe ebenso wie organische Metaboliten zu erfassen. Mit der MZmine-gestützten Rohdatenauswertung konnten Substanzen und Substanzgruppen ermittelt werden, die besonders starken Veränderungen unter Eisenmangel oder Seneszenz unterliegen. So war die Voraussetzung gegeben, Kandidaten zu selektieren, deren weitere Auswertung zur Klärung von Metalltransportvorgängen in Pflanzen beitragen kann. In der Untersuchungsreihe konnten hierfür vor allem die Metaboliten des Citratzyklus und Aminosäuren identifiziert werden, die besonders starken Veränderungen unterliegen. Beispielsweise konnten offensichtliche Parallelen zwischen erhöhten Gehalten an Metall-Phytosiderophor-Komplexen und einigen Aminosäuren nachgewiesen werden. Diese bisher unbekanntes Zusammenhänge können als Anstoß für folgende

biologische Experimente dienen.

PCA-Analyse

Die Hauptkomponenten-Analyse (PCA) ist eine mathematische Methode, die es erlaubt, mehrdimensionale Datenmengen auf zweidimensionale Darstellungen zu vereinfachen. Dabei werden ohne Vorbedingungen die Faktoren bestimmt, die den größten Anteil an den Eigenschaften des Datensatzes haben. Diese Faktoren werden verwendet, um verschiedene Datensätze miteinander zu vergleichen und die Ähnlichkeit oder Abweichungen darzustellen. Auf diese Weise ist es möglich, völlig unbekannte Abhängigkeiten festzustellen.

Für die untersuchte Probenreihe wurden zunächst zielgerichtet die bekannten Analyten untersucht und die dabei auftretenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Ernährungszuständen analysiert. Des Weiteren wurden einige weitere Metaboliten identifiziert, auf die der jeweilige Ernährungszustand einen Einfluss hatte und eine Untersuchung der zugehörigen Metabolitengruppen vorgenommen. Mit Hilfe der PCA sollen die Datensätze ohne Vorbedingungen miteinander verglichen werden. Dabei soll die PCA unbekannte Unterscheidungsfaktoren identifizieren. Mit der in MZmine implementierten PCA-Funktion ist ein Zugriff auf diese Faktoren noch nicht möglich. Jedoch kann die PCA zeigen, inwieweit die Datensätze unterscheidbar sind (Analyten wie die Metallkomplexe kommen in Pflanzen in sehr geringen Mengen vor, so dass fraglich ist, ob die Unterschiede für eine Unterscheidung mit PCA ausreichend sind). In Zukunft lassen sich vielleicht über die PCA-Faktoren unbekannte Marker-Substanzen für bestimmte Ernährungszustände identifizieren.

In dieser Arbeit wurden jeweils die vier Ernährungszustände innerhalb eines Experimentes zum Vergleich mittels PCA herangezogen. Für die folgende Auswertung werden die Ergebnisse des mittleren Massenbereiches (150-500 m/z) verwendet. Dieser Massenbereich beinhaltet den größten Teil der hier untersuchten Analyten. Die zwei anderen Massenbereiche werden hier nicht abgebildet, die Abbildungen sind im Anhang zu finden.

Zunächst wurden die ältesten und zweitältesten Blätter der bereits nach vier Tagen geernteten und unter Eisenmangel gezogenen Pflanzen in der PCA analysiert. Die Eisenmangel-Pflanzen wurden jeweils mit den Kontrollen verglichen (Abbildung 77). Die Verteilung lässt keine Unterscheidbarkeit der Proben erkennen. Dies ist

wahrscheinlich auf den kurzen Zeitraum des Eisenmangelzustandes nach neun Tagen ausreichender Versorgung zurückzuführen, in dem noch keine messbaren Unterschiede im Metabolom entstanden sind.

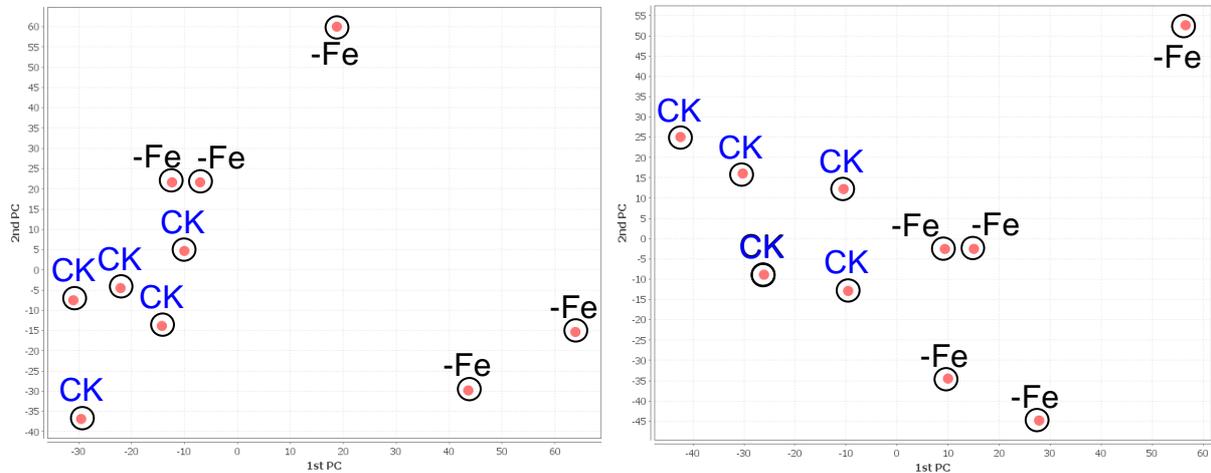


Abbildung 77: links: PCA ältestes Blatt (h1E2OL), Vergleich Eisenmangel (-Fe) vs. Kontrolle (CK); rechts: PCA zweitältestes Blatt (h1E2SOL), Vergleich Eisenmangel (-Fe) vs. Kontrolle (CK); Massenbereich 150-500

Für die anderen Versuchsteile wurden die vier Ernährungszustände (-Fe, +Fe, mit und ohne Seneszenzauslösung) eines Pflanzenteils in die PCA einbezogen.

Im Gegensatz zur ersten Ernte in Experiment 2 zeigt die Ernte nach neun Tagen und Seneszenz durch Stickstoffmangel sowohl für das älteste (OL) als auch für das zweitälteste Blatt (SOL) deutliche Unterschiede für die einzelnen Ernährungszustände (-Fe-N; -Fe; -N; CK) (Abbildung 78, Abbildung 79). Die interne Streuung der Replikate ist sehr gering, während die Gruppen sehr deutlich voneinander getrennt sind. Das bedeutet, dass die Seneszenz durch Stickstoffmangel sowie der Eisenmangel zu auch in der Hauptkomponentenanalyse gut messbaren Unterschieden in der Zusammensetzung des Pflanzenextraktes führten. Dies bestätigt, dass der biologische Versuchsansatz gut gewählt ist und zu signifikanten Unterschieden in den Pflanzenproben führt. Diese Unterscheidungsfaktoren sind mit der hier verwendeten PCA nicht auswertbar. Der große Unterschied zeigt aber, dass mit Modifikationen oder Austausch der verwendeten Software die Möglichkeit besteht, zahlreiche weitere charakteristische Unterschiede zu finden.

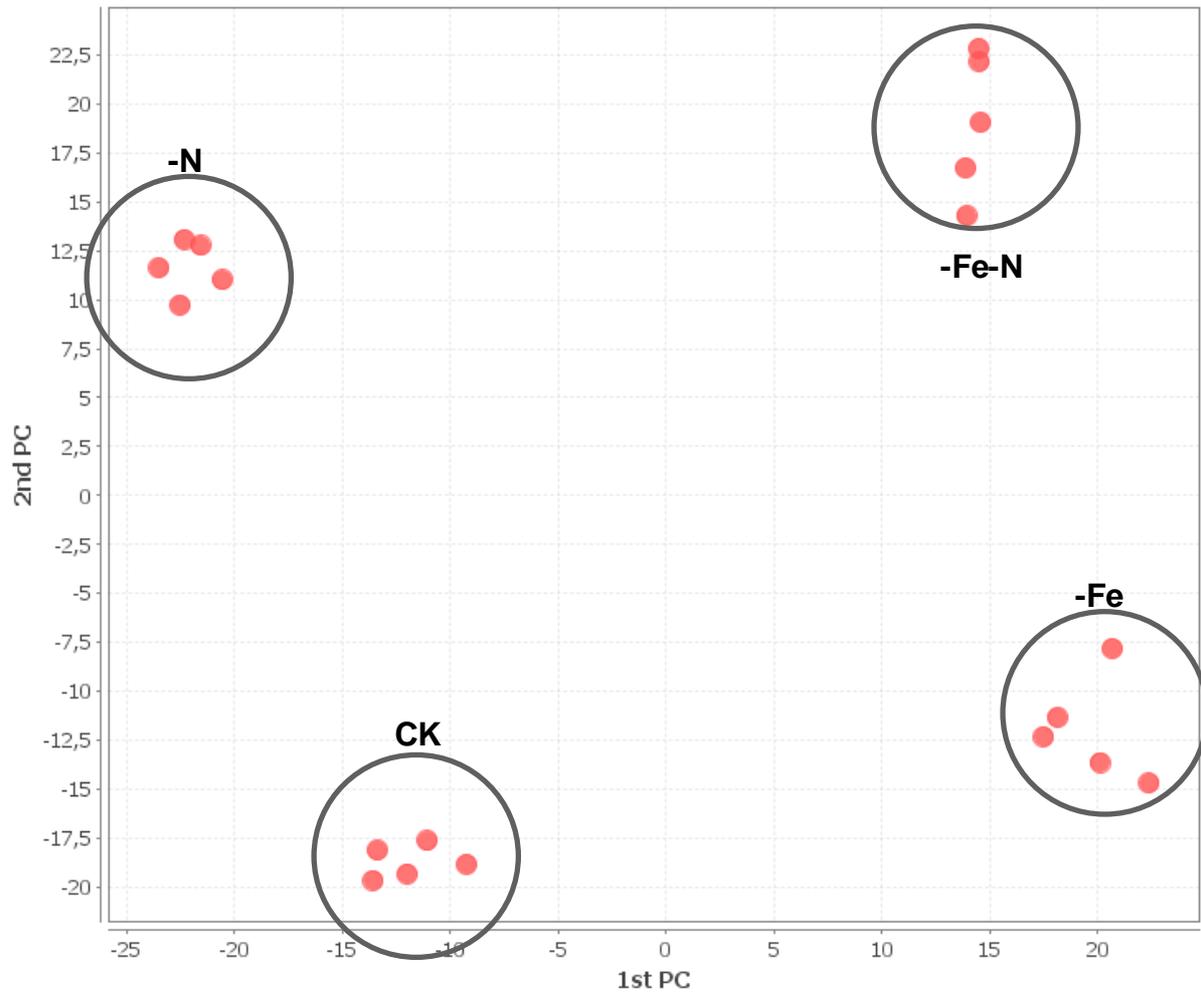


Abbildung 78: PCA-Analyse des zweiten Experimentes (Seneszenzauslösung durch Stickstoffmangel, Tabelle 1), untersucht wurde das zweitälteste Blatt (h2E2SOL); die Proben mit Stickstoffmangel (-N), mit Eisenmangel (-Fe), mit Eisen- und Stickstoffmangel (-Fe -N) unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (CK) und voneinander

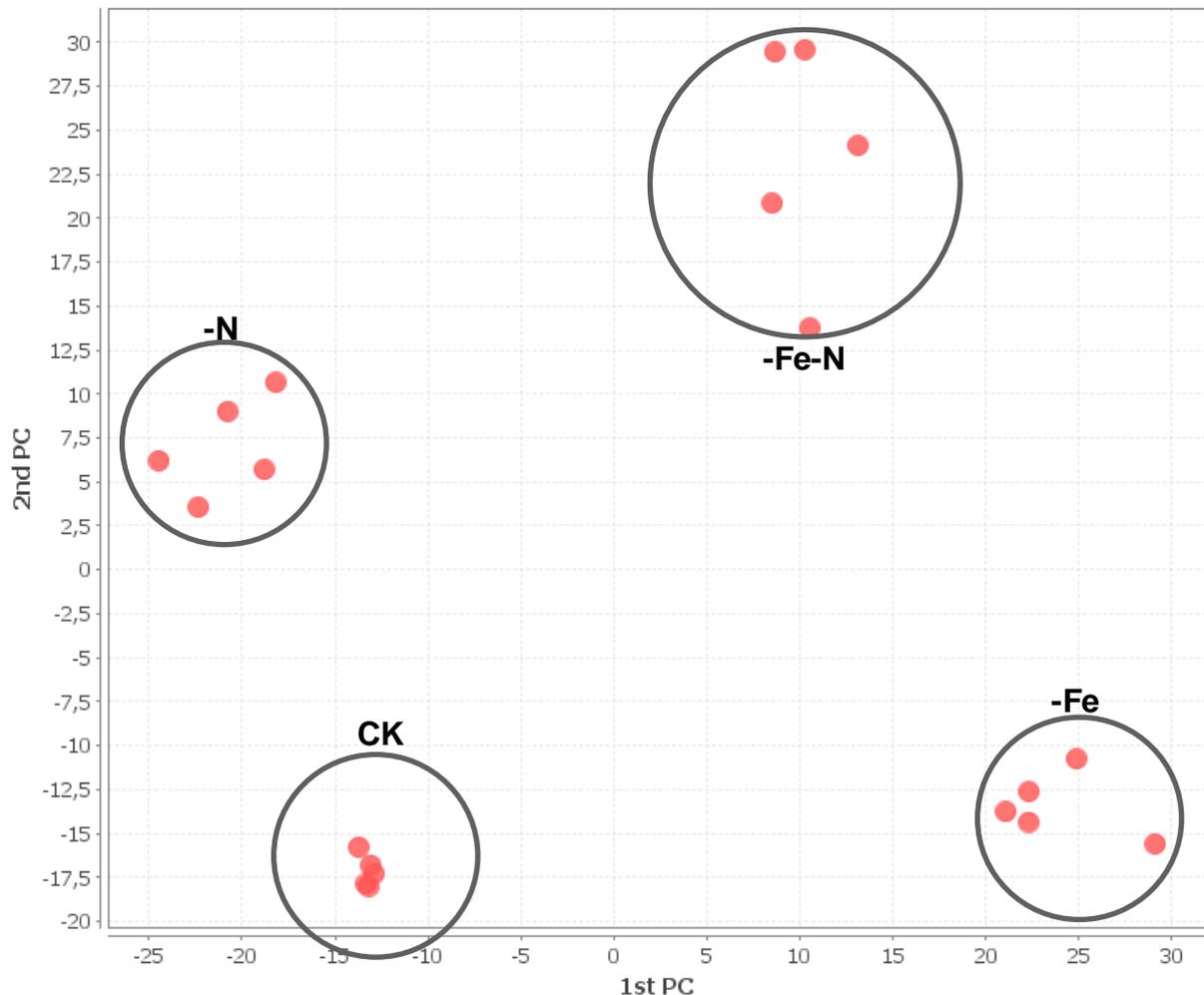


Abbildung 79: PCA-Analyse des zweiten Experimentes (Seneszenzauslösung durch Stickstoffmangel, Tabelle 1), untersucht wurde das älteste Blatt (h2E2OL); die Proben mit Stickstoffmangel (-N), mit Eisenmangel (-Fe), mit Eisen- und Stickstoffmangel (-Fe -N) unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (CK) und von einander

Im dritten Experiment (Seneszenz ausgelöst durch Beschattung) ist die Unterscheidung der Gruppen für das älteste Blatt ebenso eindeutig wie die oben dargestellten Ergebnisse, wie Abbildung 80 zeigt. Das bedeutet, dass sich die einzelnen Gruppen im Bezug auf eine der Hauptkomponenten jeweils um das Drei- bis Sechsfache ihrer internen Streuung voneinander unterscheiden. Alle vier miteinander verglichenen Gruppen weisen auf den Skalen der Hauptkomponenten unterschiedliche Vorzeichenkombinationen auf.

Für das zweitälteste Blatt konnte dagegen lediglich eine Unterscheidung zwischen Eisenmangel und Kontrolle dargestellt werden. Die Proben der zweitältesten Blätter der beschatteten Pflanzen unterscheiden sich nicht eindeutig von den zugehörigen

Kontrollproben (Abbildung 81). Eine Theorie hierfür ist, dass dies mit dem Aufbau des Versuches zusammenhängt. Hierbei wurden nur die ältesten Blätter mit Aluminiumfolie umwickelt, so dass auch nur in diesen die Seneszenz ausgelöst wurde. Im Gegensatz zum Stickstoffmangel betrifft die Beschattung also nicht die gesamte Pflanze und die nicht betroffenen zweitältesten Blätter lassen sich auch nicht analytisch aufgrund von Seneszenzauslösung unterscheiden. Der Eisenmangel dagegen wurde analytisch gut dargestellt.

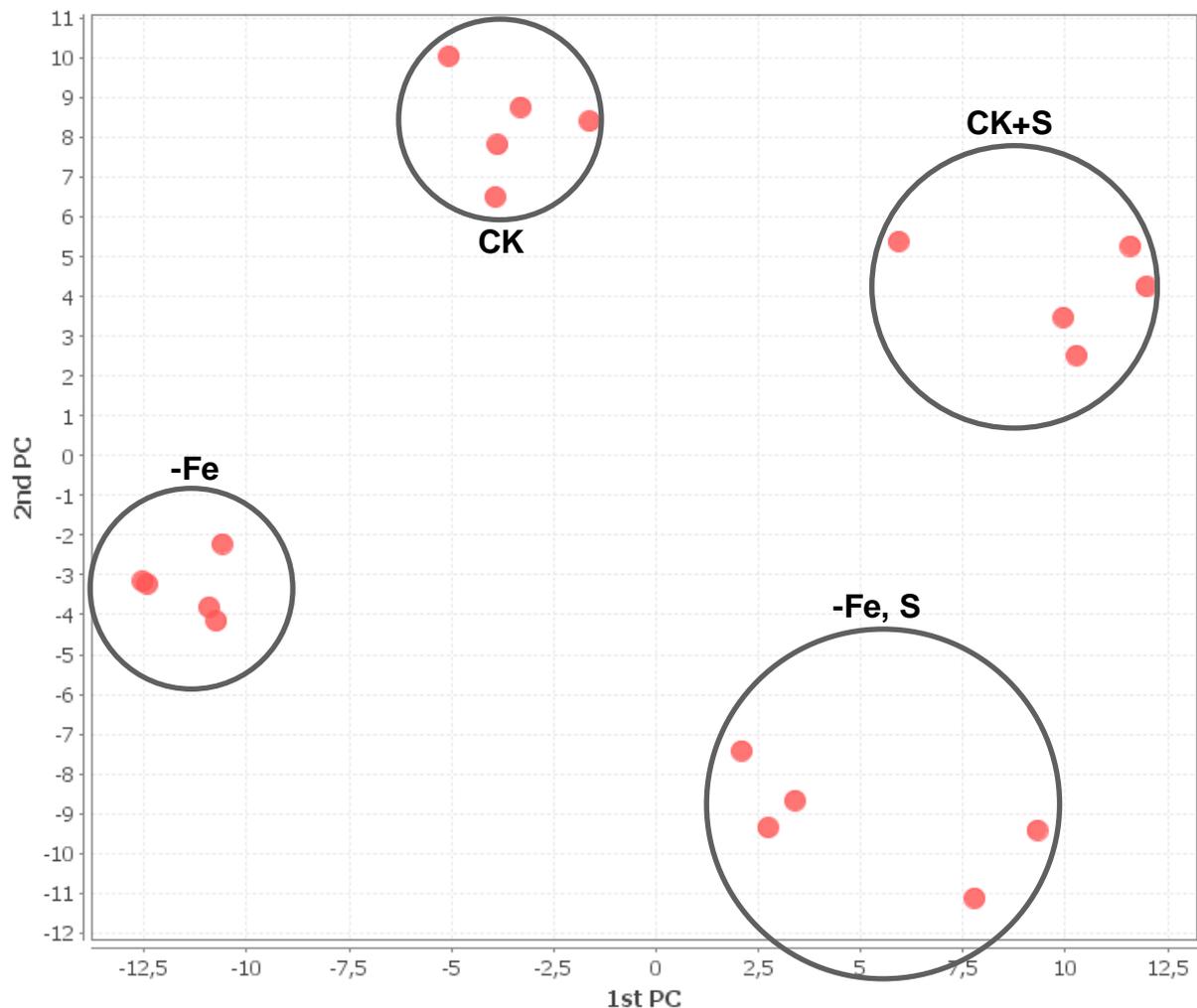


Abbildung 80: PCA-Analyse des dritten Experimentes (Seneszenz durch Beschattung, Tabelle 1), untersucht wurde das älteste Blatt (hE3OL); die Proben mit Eisenmangel (-Fe), mit Eisenmangel und beschattet (-Fe, S), Kontrolle beschattet (CK+S) unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (CK) und voneinander

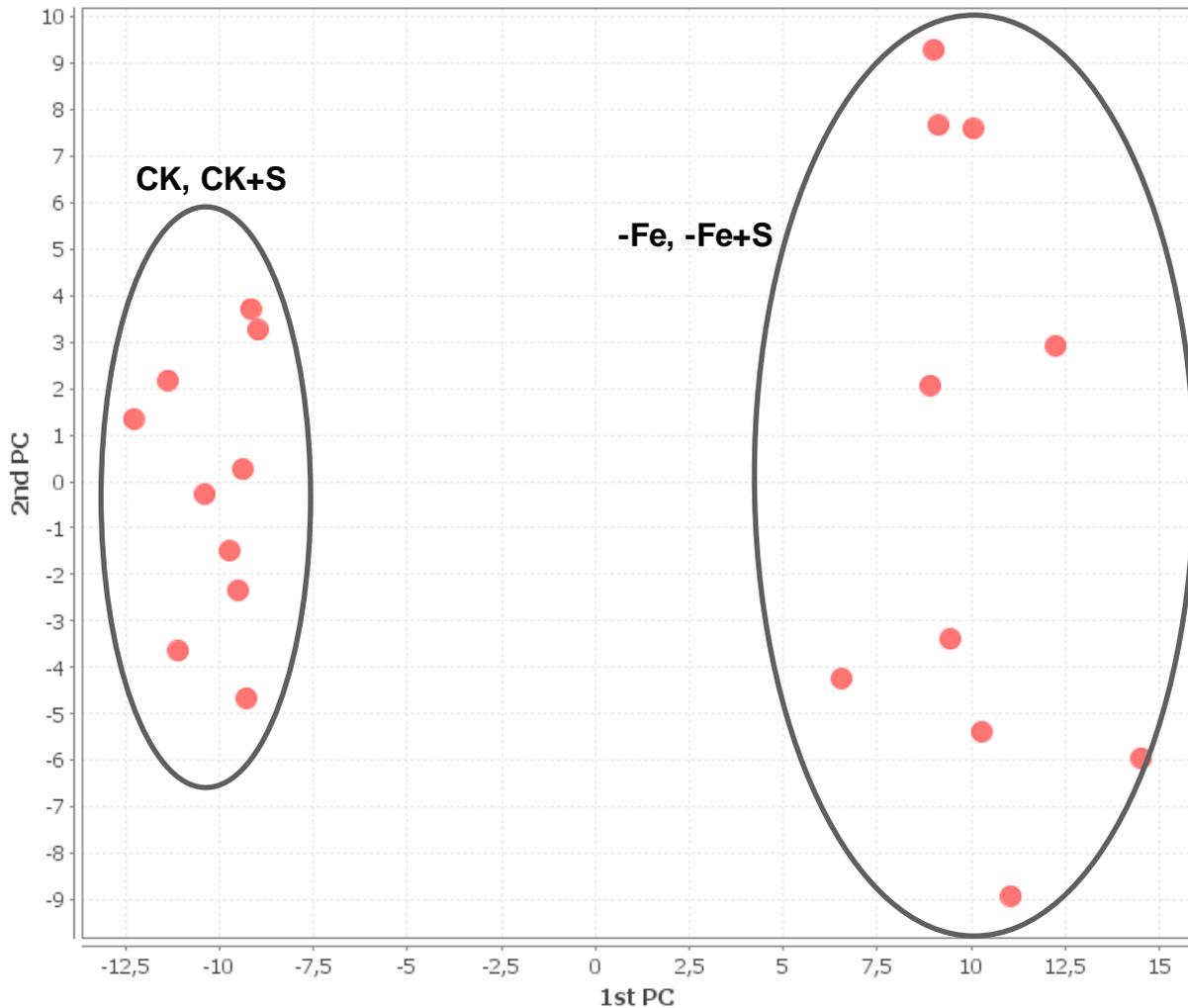


Abbildung 81: PCA-Analyse des Experiment 3 (Seneszenz durch Beschattung, Tabelle 1), untersucht wurde das zweitälteste Blatt (hE3SOL); die Proben mit Eisenmangel (-Fe) und mit Eisenmangel und beschattet (-Fe, S) unterscheiden sich signifikant von Kontrolle beschattet (CK+S) und der Kontrolle (CK), die zwei Gruppen -Fe und -Fe+ S sowie CK und CK+S lassen sich in diesem Fall nicht eindeutig unterscheiden; Massenbereich 150-500 m/z

Die Auswertung der zwei anderen Massenbereiche (65-175 m/z, 450-1000 m/z) erfolgte auf die gleiche Weise wie hier für den mittleren Massenbereich dargestellt. Die Ergebnisse sind analog, die Unterscheidungen sind dabei genauso deutlich sichtbar. Die Abbildungen hierzu sind im Anhang zu finden.

Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse wurde gezeigt, dass die entwickelte Methode genügend Informationen über die Eigenschaften der Proben liefert, um sie von den anderen Proben zu unterscheiden.

Die PCA-Analyse lässt Aussagen über die Probe zu, die über den Informationsgehalt von Scatterplots hinausgehen. Um diese Informationen in vollem Umfang zugänglich zu machen, ist eine Modifikation der verwendeten Software notwendig.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Metalltransportprozesse in Pflanzen sind ein sehr aktuelles Arbeitsgebiet in der Pflanzenernährung, doch trotz intensiver Forschung wurden die Metallverteilungswege auf der molekularen Ebene noch nicht annähernd aufgeklärt und verstanden. Es existiert bereits einiges Wissen über Transporter (Transportproteine) und über deren genetische Regulation. Doch besonders das Wissen über niedermolekulare Metallspezies und ihre Rolle im Transportprozess ist bisher sehr lückenhaft. Diese Lücken sind auf die mangelnde Stabilität der kleinen Metallspezies zurückzuführen, die ein Problem für die Analytik darstellt. Es werden Trennverfahren benötigt, aber jede Trennung führt zu einer Störung bestehender Speziesgleichgewichte, wobei die Gefahr der Dissoziation oder Artefaktbildung besteht. Außerdem verringert jedes Trennverfahren die Konzentration der Analyten, die in der Probe als Spurenbestandteil vorliegen. Daher sind je nach Probe spezieserhaltende Konzentrierungstechniken notwendig. Aufgabe in dieser Arbeit war, die Lücken in der bestehenden Analytik für niedermolekulare Metallspezies zu verkleinern, indem neue, spezieserhaltende Trenn- und Konzentrierungsverfahren entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden in drei Bereichen neue Erkenntnisse gewonnen.

- I) Es wurde ein Konzentrierungsverfahren für Metallspezies entwickelt
- II) Es wurde ein Verfahren für die Trennung und Identifizierung labiler Spezies entwickelt
- III) Es wurde demonstriert, dass relevante biologische Fragestellungen auf Basis des entwickelten Trennverfahrens bearbeitet werden können

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein neues Verfahren auf Basis von Isoelektrischer Fokussierung (IEF) entwickelt, mit dem Metallkomplexe an ihrem pI-Wert fokussiert werden. Die Annahme, dass Metallkomplexe einen stabilen pI-Wert besitzen, der sich analytisch ausnutzen lässt, stellte einen völlig neuen Ansatz dar. Gleichzeitig werden in diesem Verfahren Matrixbestandteile von den Metallspezies getrennt.

Die Untersuchungen zeigten, dass Metallkomplexe stabil fokussierbar sind, also einen pI-Wert besitzen. Es wurde für synthetische und pflanzliche Komplexe gezeigt, dass verschiedene Komplexe voneinander und von freien Liganden trennbar sind.

Originalproben wurden aufgrund ihrer Fe(III)-DMA-Gehalte mit der entwickelten Methode unterschieden. IEF lässt sich in der zweiten Dimension mit einem HPLC-MS-Trennverfahren koppeln. Dies wurde am Beispiel der Trennung von Fe-DMA und freiem DMA mit IEF gezeigt. Eine Übertragung auf den analytischen Maßstab (cIEF-Technik) ermöglicht es, die im semipräparativen Maßstab nur ungenau abgeschätzten pI-Werte der Metall-Komplexe mit Hilfe interner Standards und geeigneter Ampholyte exakt zu bestimmen. Ergänzt wurden die Ergebnisse mit CE-Messungen, die weitere Informationen zum Charakter der gebildeten Komplexe beitrugen.

Das zweite wichtige Ergebnis der Arbeit bezieht sich auf die Trennung von kleinen Metallkomplexen. Es konnte ein Verfahren entwickelt werden, mit dem Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Spezies getrennt und identifiziert wurden. Diese Metall-Liganden-Systeme werden aufgrund indirekter Untersuchungen allgemein als wichtige Transportsysteme angenommen, konnten bisher auf molekularer Ebene aber nicht getrennt und identifiziert werden. In dieser Arbeit wurden zwei Gruppen von Eisen-Citrat-Spezies voneinander getrennt. Neben den Hauptspezies (Spezies mit 3:3- und 3:4-Stöchiometrie) wurden zusammen mit der 3:4-Spezies zwei weitere Spezies identifiziert. Diese wurden aufgrund weiterer Untersuchungen, wie MS²-Untersuchungen zur Fragmentierungsstabilität, als Fragmente der 3:4-Stöchiometrie identifiziert. Es wurde gezeigt, dass die Spezies nicht nur in Modellsystemen, sondern auch in Pflanzenmatrix existieren und stabil sind. In realen Pflanzenproben wurde nur eine Spezies, die 3:4-Stöchiometrie nachgewiesen, nicht aber die 3:3-Spezies. Diese Speziesverteilung ist, bei einem deutlichen Citrat-Überschuss in der Probe, im Einklang mit der Verteilung, wie sie in dieser Arbeit und in der Literatur in Abhängigkeit zum Eisen-Citrat-Verhältnis beschrieben ist. Die Ergebnisse der HILIC-Trennungen wurden mit Hilfe von CE-Messungen verifiziert.

Bei der Untersuchung der Kupfer-Histidin-Spezies wurde eine Spezies mit 1:2-Stöchiometrie identifiziert. Das ist im Einklang mit der bekannten Literatur, in der die 1:2-Spezies als stabil beschrieben wird. Neben dieser Spezies wurden wenige instabile Addukte und Spezies identifiziert. Größere Stöchiometrien wurden aufgrund ihres Elutionsverhaltens und ergänzender MS²-Untersuchungen als Addukte der 1:2-Spezies identifiziert. Die chromatographisch getrennte instabile 1:3-Spezies eluiert

zusammen mit freiem Histidin und wird dadurch stabilisiert. Die Trennung wurde sowohl in Modellmischungen als auch in Pflanzenmatrix reproduzierbar realisiert. In Pflanzenproben wurde nur eine Spezies gefunden. Auch diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von CE-Messungen verifiziert. Die zwei in der CE gemessenen Spezies sind im Einklang mit den Ergebnissen der HILIC-Trennung.

Für die Untersuchung realer pflanzenbiologischer Fragestellungen im Bereich Metalltransport sind neu entwickelte Analysenverfahren (wie z.B. für labile Fe-Citrate) zwar essentiell, aber nicht ausreichend. Es muss vielmehr ein umfassender analytischer Ansatz gefunden werden, der die gleichzeitige Analyse verschiedener Metallspezies (z.B. Citratkomplexe neben Phytosiderophorkomplexen) sowie der entsprechenden freien Liganden und einer Vielzahl pflanzlicher Metaboliten erlaubt.

Im letzten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich durch Weiterentwicklung der für Eisen-Citrate erstellten HILIC-MS-Methode ein solcher umfassender analytischer Ansatz erreichen lässt. Die Anwendung auf eine umfangreiche Probenserie zur Retranslokation von Eisen in seneszenten Pflanzen zeigte die Robustheit und praktische Relevanz der entwickelten Analytik und erhärtete die Hypothese einer Beteiligung von Eisen-Citrat an der Retranslokation von Eisen. Die labilen Metallspezies (Eisen-Citrat- und Kupfer-Histidin-Spezies) und stabile Metall-Phytosiderophor-Spezies konnten für die Serie ausgewertet und signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Proben bzw. verschiedenen Ernährungszuständen festgestellt werden. Durch softwaregestützte Auswertung wurden einige Metaboliten ermittelt, die starke Abweichungen in Verbindung mit den Ernährungszuständen bzw. Seneszenzzuständen zeigten und deren Korrelationen zu Metalltransportprozessen bisher unbekannt waren. Dabei handelt es sich um die Metaboliten des Citratzyklus und Aminosäuren. Neben der direkten Korrelation von Metaboliten/Liganden zu pflanzlichen Zuständen konnte gezeigt werden, dass auch ohne biologische bzw. chemische Vorinformationen die verschiedenen Ernährungszustände durch PCA-basierte Auswertung signifikant unterschieden werden konnten. Diese PCA-Ergebnisse belegen sowohl sehr deutlich die geringe Streuung der biologischen Replikate wie auch die großen Unterschiede zwischen den Ernährungszuständen.

Für zukünftige Arbeiten ergeben sich folgende Ansatzpunkte:

Im Rahmen der PCA-basierten Auswertung wäre es sehr sinnvoll, die Unterschiede in PCA-Plots auf die zugrunde liegenden Merkmale (wie die getrennten Verbindungen) zurückzuführen. Das ist prinzipiell möglich, erfordert jedoch andere Software-Lösungen. So könnten weitere Metaboliten bzw. Gruppen identifiziert werden, deren Veränderungen mit dem Metalltransport zusammenhängen und die somit zur Aufklärung von Mechanismen beitragen können.

Die Metabolitgruppen, die in der untersuchten Probenserie bereits durch Gehaltsänderungen aufgefallen sind (Aminosäuren, Metaboliten des Citratzyklus), stellen potentielle Liganden für den Metalltransport dar. Um ihre Rolle im innerpflanzlichen Metalltransport zu untersuchen, wäre es notwendig, biologische Probenreihen zu konzipieren, die sinnvolle Rückschlüsse erlauben und eine Analyse-methode zu entwickeln, die analog zur in dieser Arbeit für Citrate und Histidine entwickelten Methode die Möglichkeit bietet, entsprechende Metallspezies zu identifizieren.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Untersuchung von Fe(II)-Komplexen, die in dieser Arbeit ausgeklammert war. Die bisher nicht eindeutig identifizierten Signale in den CE-Trennungen, bei denen es sich vermutlich um Fe(II)-Citrat-Komplexe handelt, lassen vermuten, dass CE eine geeignete Trennmethode wäre, um Fe(II)-Metallkomplexe zu untersuchen. Mit diesen Ansätzen könnte das Wissen um den innerpflanzlichen Metalltransport in Zukunft erweitert werden.

8 Literatur

1. Staiger, D., *Wie gelangt Eisen in die Pflanze?* Angewandte Chemie, 2002. **114**(24): p. 4807.
2. Guerinot, M.L.Y., Y., *Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available.* Plant Physiol., 1994. **104**: p. 815-820.
3. Garrido, S.M.M., C.K.; Nakanishi, H.; Saigusa, M., *Strategies for Iron Mobilization and Uptake in Plants Roots.* Tohoku Journal of Agricultural Reserch, 2006. **56**: p. 21-35.
4. Kim, S.A. and M.L. Guerinot, *Mining iron: Iron uptake and transport in plants.* Febs Letters, 2007. **581**(12): p. 2273-2280.
5. Meda, A.R., Meda, A. R., Scheuermann, E. B, Prechsl, U. E., Erenoglu, B., Schaaf, G., Hayen, H., Weber, G., von Wiren, N, Iron acquisition by phytosiderophores contributes to cadmium tolerance. Plant Physiology, 2007. **143**(4): p. 1761-1773.
6. Bienfait, H.F., Regulated Redox Processes at the Plasmalemma of Plant-Root Cells and Their Function in Iron Uptake. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1985. **17**(2): p. 73-83.
7. Rogers, E.E., D.J. Eide, and M.L. Guerinot, *Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(22): p. 12356-12360.
8. Li, L.T. and J. Kaplan, Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(35): p. 22181-22187.
9. Takahashi, M., Yamaguchi, H., Nakanishi, H., Shioiri, T., Nishizawa, N. K., Mori, S., Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (strategy II) in graminaceous plants. Plant Physiology, 1999. **121**(3): p. 947-956.
10. Takahashi, M., Nakanishi, H., Kawasaki, S., Nishizawa, N. K., Mori, S., Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. Nature Biotechnology, 2001. **19**(5): p. 466-469.
11. Namba, K. and Y. Murata, Toward Mechanistic Elucidation of Iron Acquisition in Barley: Efficient Synthesis of Mugineic Acids and Their Transport Activities. Chemical Record. **10**(2): p. 140-150.
12. Ma, J.F., Plant root responses to three abundant soil minerals: Silicon, aluminum and iron. Critical Reviews in Plant Sciences, 2005. **24**(4): p. 267-281.
13. Hider, R.C., Yoshimura, E., Khodr, H., von Wiren, N., Competition or complementation: the iron-chelating abilities of nicotianamine and phytosiderophores. New Phytologist, 2004. **164**(2): p. 204-208.
14. Römheld, V.M., H., Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. Plant and

- Soil, 1990. **123**: p. 147-153.
15. Briat, J.F., C. Curie, and F. Gaymard, *Iron utilization and metabolism in plants*. Current Opinion In Plant Biology, 2007. **10**(3): p. 276-282.
 16. Morrissey, J. and M.L. Guerinot, *Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome*. Chemical Reviews, 2009. **109**(10): p. 4553-4567.
 17. von Wiren, N., H. Khodr, and R.C. Hider, Hydroxylated phytosiderophore species possess an enhanced chelate stability and affinity for iron(III). Plant Physiology, 2000. **124**(3): p. 1149-1157.
 18. Treeby, M., H. Marschner, and V. Romheld, Mobilization of Iron and Other Micronutrient Cations from a Calcareous Soil by Plant-Borne, Microbial, and Synthetic Metal Chelators. Plant and Soil, 1989. **114**(2): p. 217-226.
 19. Awad, F. and V. Romheld, Mobilization of heavy metals from contaminated calcareous soils by plant born, microbial and synthetic chelators and their uptake by wheat plants. Journal of Plant Nutrition, 2000. **23**(11-12): p. 1847-1855.
 20. Shenker, M., T.W.M. Fan, and D.E. Crowley, *Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants*. Journal of Environmental Quality, 2001. **30**(6): p. 2091-2098.
 21. Mori, S., *Iron acquisition by plants*. Current Opinion In Plant Biology, 1999. **2**(3): p. 250-253.
 22. Clemens, S., Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta, 2001. **212**(4): p. 475-486.
 23. Pilon, M., Cohu, C. M., Ravet, K., Abdel-Ghany, S. E., Gaymard, F., *Essential transition metal homeostasis in plants*. Current Opinion In Plant Biology, 2009. **12**(3): p. 347-357.
 24. Puig, S. and L. Penarrubia, *Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants*. Current Opinion in Plant Biology, 2009. **12**(3): p. 299-306.
 25. Rellan-Alvarez, R., Giner-Martinez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodriguez-Castrillon, J. A., Garcia-Alonso, J. I., Abadia, J., Alvarez-Fernandez, A., Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long-Distance Transport. Plant And Cell Physiology, 2009. **51**(1): p. 91-102.
 26. Silva, A.M.N., Kong, X., Parkin, M. C., Cammack, R., Hider, R. C., *Iron(III) citrate speciation in aqueous solution*. Dalton Transactions, 2009(40): p. 8616-8625.
 27. Gautier-Luneau, I., Merle, C., Phanon, D., Lebrun, C., Biaso, F., Serratrice, G., Pierre, J. L., New trends in the chemistry of iron(III) citrate complexes: Correlations between X-ray structures and solution species probed by electrospray mass spectrometry and kinetics of iron uptake from citrate by iron chelators. Chemistry-a European Journal, 2005. **11**(7): p. 2207-2219.
 28. Rellan-Alvarez, R., J. Abadia, and A. Alvarez-Fernandez, Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass

- spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008. **22**(10): p. 1553-1562.
29. von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J. F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R. A., Hider, R. C., Nicotianamine chelates both Fe-III and Fe-II. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology*, 1999. **119**(3): p. 1107-1114.
 30. Brown, J.C., Fe and Ca Uptake as Related to Root-Sap and Stem-Exudate Citrate in Soybeans. *Physiologia Plantarum*, 1966. **19**(4): p. 968-&.
 31. Brown, J.C. and R.L. Chaney, Effect of Iron on the Transport of Citrate into the Xylem of Soybeans and Tomatoes. *Plant Physiol.*, 1971. **47**(6): p. 836-840.
 32. Lopez-Millan, A.F., Morales, F., Abadia, A., Abadia, J., Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiology*, 2000. **124**(2): p. 873-884.
 33. Lopez-Millan, A.F., Morales, F., Abadia, A., Abadia, J., Iron deficiency-associated changes in the composition of the leaf apoplastic fluid from field-grown pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Journal of Experimental Botany*, 2001. **52**(360): p. 1489-1498.
 34. Schaumlöffel, D., Ouerdane, L., Bouyssié, B., Lobinski, R., Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP MS and electrospray MS-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003. **18**(2): p. 120-127.
 35. Weber, G., G. Neumann, and V. Romheld, Speciation of iron coordinated by phytosiderophores by use of HPLC with pulsed amperometric detection and AAS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002. **373**(8): p. 767-771.
 36. Bakkaus, E., Collins, R. N., Morel, J. L., Gouget, B., Anion exchange liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry detection of the Co²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ and Ni²⁺ complexes of mugineic and deoxymugineic acid. *Journal Of Chromatography A*, 2006. **1129**(2): p. 208-215.
 37. Xuan, Y., Scheuermann, E. B., Meda, A. R., Hayen, H., von Wiren, N., Weber, G., Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*, 2006. **1136**(1): p. 73-81.
 38. Cobbett, C. and P. Goldsbrough, *Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis*. *Annual Review of Plant Biology*, 2002. **53**: p. 159-182.
 39. Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J. F., Gaymard, F., Cellier, F., Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 2009. **57**(3): p. 400-412.
 40. Kobayashi, T., H. Nakanishi, and N.K. Nishizawa, *Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops*. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*, 2010. **86**(9): p. 900-913.
 41. Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S. L., Briat, J. F., Walker, E. L., Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 346-349.

42. Murata, Y., Ma, J. F., Yamaji, N., Ueno, D., Nomoto, K., Iwashita, T., A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant Journal*, 2006. **46**(4): p. 563-572.
43. Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, K., Nakazono, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N. K., Rice OsYSL15 Is an Iron-regulated Iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(6): p. 3470-3479.
44. Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsushashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N. K., *Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺*. *Plant Journal*, 2006. **45**(3): p. 335-346.
45. Kobayashi, T. and N.K. Nishizawa, *Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants*, in *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63, S.S. Merchant, Editor. 2012, Annual Reviews: Palo Alto. p. 131-152.
46. Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N. K., OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant Journal*, 2004. **39**(3): p. 415-424.
47. Higuchi, K., Watanabe, S., Takahashi, M., Kawasaki, S., Nakanishi, H., Nishizawa, N. K., Mori, S., Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *Plant Journal*, 2001. **25**(2): p. 159-167.
48. Durrett, T.P., W. Gassmann, and E.E. Rogers, The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation. *Plant Physiol.*, 2007. **144**(1): p. 197-205.
49. Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N. K., A rice FRD3-like (OsFRDL1) gene is expressed in the cells involved in long-distance transport. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2004. **50**(7): p. 1133-1140.
50. Green, L.S. and E.E. Rogers, *FRD3 controls iron localization in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2004. **136**(1): p. 2523-2531.
51. Morrissey, J., Baxter, I. R., Lee, J., Li, L. T., Lahner, B., Grotz, N., Kaplan, J., Salt, D. E., Guerinot, M. L., The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2009. **21**(10): p. 3326-3338.
52. Burkhead, J.L., Reynolds, K. A. G., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Pilon, M., *Copper homeostasis*. *New Phytologist*, 2009. **182**(4): p. 799-816.
53. Andres-Colas, N., Sancenon, V., Rodriguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D. J., Ecker, J. R., Puig, S., Penarrubia, L., The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant Journal*, 2006. **45**(2): p. 225-236.
54. Yruela, I., Copper in plants, in *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2005, scielo. p. 145-156.
55. Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N. K., Mori, S., Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the

- biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiology*, 1999. **119**(2): p. 471-479.
56. Ma, J.F., Taketa, S., Chang, Y. C., Takeda, K., Matsumoto, H., Biosynthesis of phytosiderophores in several Triticeae species with different genomes. *Journal of Experimental Botany*, 1999. **50**(334): p. 723-726.
57. Ma, J.F., Taketa, S., Chang, Y. C., Iwashita, T., Matsumoto, H., Takeda, K., Nomoto, K., Genes controlling hydroxylations of phytosiderophores are located on different chromosomes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, 1999. **207**(4): p. 590-596.
58. Scholz, G., G. Schlesier, and K. Seifert, *Effect of Nicotianamine on Iron Uptake by the Tomato Mutant Chloronerva*. *Physiologia Plantarum*, 1985. **63**(1): p. 99-104.
59. Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S., Nishizawa, N. K., Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, 2003. **15**(6): p. 1263-1280.
60. Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., Mari, S., Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*, 2009. **103**(1): p. 1-11.
61. Lensbouer, J.J., Patel, A., Sirianni, J. P., Doyle, R. P., Functional characterization and metal ion specificity of the metal-citrate complex transporter from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 2008. **190**(16): p. 5616-5623.
62. Braun, V., S. Mahren, and A. Sauter, *Gene regulation by transmembrane signaling*. *Biometals*, 2005. **18**(5): p. 507-517.
63. Banci, L., Bertini, I., McGreevy, K. S., Rosato, A., *Molecular recognition in copper trafficking*. *Natural Product Reports*, 2010. **27**(5): p. 695-710.
64. Liao, M.T., Hedley, M. J., Woolley, D. J., Brooks, R. R., Nichols, M. A., Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rondy) plants grown in NFT system. I. Copper uptake and distribution in plants. *Plant And Soil*, 2000. **221**(2): p. 135-142.
65. Liao, M.T., Hedley, M. J., Woolley, D. J., Brooks, R. R., Nichols, M. A., Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondy) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant and Soil*, 2000. **223**(1-2): p. 243-252.
66. Irtelli, B., W.A. Petrucci, and F. Navari-Izzo, Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess. *Journal of Experimental Botany*, 2009. **60**(1): p. 269-277.
67. Xuan, Y., Scheuermann, E. B., Meda, A. R., Jacob, P., von Wiren, N., Weber, G., *CE of phytosiderophores and related metal species in plants*. *Electrophoresis*, 2007. **28**(19): p. 3507-3519.
68. Kuban, P. and P.C. Hauser, Ten years of axial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE - a review. *Electrophoresis*, 2009.

- 30**(1): p. 176-188.
69. Weber, G., N. von Wiren, and H. Hayen, Hydrophilic interaction chromatography of small metal species in plants using sulfobetaine- and phosphorylcholine-type zwitterionic stationary phases. *Journal of Separation Science*, 2008. **31**(9): p. 1615-1622.
 70. Nguyen, H.P. and K.A. Schug, The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *Journal of Separation Science*, 2008. **31**(9): p. 1465-1480.
 71. Alpert, A.J., Hydrophilic-Interaction Chromatography For The Separation Of Peptides, Nucleic-Acids And Other Polar Compounds. *Journal Of Chromatography*, 1990. **499**: p. 177-196.
 72. Hemstrom, P. and K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*. *Journal of Separation Science*, 2006. **29**(12): p. 1784-1821.
 73. Hayen, H., *HILIC- separation of polar compounds*. *Nachrichten Aus Der Chemie*, 2010. **58**(4): p. 461-464.
 74. Szpunar, J. and R. Lobinski, *Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002. **373**(6): p. 404-411.
 75. Rosenberg, E., The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, 2003. **1000**(1-2): p. 841-889.
 76. Lobinski, R. and M. Potin-Gautier, *Metals and biomolecules - bioinorganic analytical chemistry*. *Analusis*, 1998. **26**(6): p. M21-M24.
 77. Stewart, II, *Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation*. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 1999. **54**(12): p. 1649-1695.
 78. University of Bristol, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>
 79. Svensson, H., Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. I. The Differential Equation of Solute Concentrations at a Steady State and its Solution for Simple Cases. *Acta Chemica Scandinavica*, 1961. **15**: p. 325-341.
 80. Svensson, H., Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. II. Buffering Capacity and Conductance of Isoionic Ampholytes. *Acta Chemica Scandinavica*, 1962. **16**.
 81. Prochazkova, B., E. Glovinova, and J. Pospichal, *Analysis of amino acids by combination of carrier ampholyte-free IEF with ITP*. *Electrophoresis*, 2007. **28**(13): p. 2168-2173.
 82. Michalke, B. and P. Schramel, Application of capillary zone electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and capillary isoelectric focusing-inductively coupled plasma mass spectrometry for selenium speciation. *Journal of Chromatography A*, 1998. **807**(1): p. 71-80.
 83. Viglio, S., Fumagalli, M., Ferrari, F., Iadarola, P., MEKC: A powerful tool for the determination of amino acids in a variety of biomatrices. *Electrophoresis*, 2010. **31**(1): p. 93-104.

84. Poinso, V., Rodat, A., Gavard, P., Feurer, B., Couderc, F., *Recent advances in amino acid analysis by CE*. Electrophoresis, 2008. **29**(1): p. 207-223.
85. Langrock, T., P. Czihal, and R. Hoffmann, Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry. *Amino Acids*, 2006. **30**(3): p. 291-297.
86. Cserháti, T., *Chromatography of amino acids and short peptides. New advances*. 2007. p. 780-796.
87. Michalke, B., *Quality-Control in Speciation Investigations*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1994. **350**(1-2): p. 2-6.
88. Scapolan, S., Ansoborlo, E., Moulin, C., Madic, C., Uranium speciation in biological medium by means of capillary electrophoresis and time-resolved laser-induced fluorescence. *Journal Of Radioanalytical And Nuclear Chemistry*, 1997. **226**(1-2): p. 145-148.
89. Michalke, B. and P. Schramel, Selenium speciation by interfacing capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 1998. **19**(2): p. 270-275.
90. Schumacher, E., *Über fokussierenden Ionenaustausch I. Prinzip und einfache Theorie*. Helvetica Chimica Acta, 1957. **40**(1): p. 221-228.
91. Schumacher, E., *Über fokussierenden Ionenaustausch IV. Zur Theorie des Fokussierungseffektes*. Helvetica Chimica Acta, 1957. **40**(7): p. 2322-2340.
92. Friedli, W. and E. Schumacher, *Über elektrophoretische Ionenfokussierung X. Die Analyse von Seltenen Erdgemischen*. Helvetica Chimica Acta, 1961. **44**(7): p. 1829-1856.
93. Schonhofer, F. and F. Grass, *Theory of Electrophoretic Ion Focussing of Inorganic-Ions with Weak Complexing Agents*. *Journal of Chromatography*, 1975. **110**(2): p. 265-272.
94. Dell'mour, M., Koellensperger, G., Quirino, J. P., Haddad, P. R., Stanetty, C., Oburger, E., Puschenreiter, M., Hann, S., Complexation of metals by phytosiderophores revealed by CE-ESI-MS and CE-ICP-MS. *Electrophoresis*, 2010. **31**(7): p. 1201-1207.
95. Ouerdane, L., Mari, S., Czernic, P., Lebrun, M., Lobinski, R., Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *Journal Of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006. **21**(7): p. 676-683.
96. Howe, J.A., Choi, Y. H., Loeppert, R. H., Wei, L. C., Senseman, S. A., Juo, A. S. R., Column chromatography and verification of phytosiderophores by phenylisothiocyanate derivatization and UV detection. *Journal Of Chromatography A*, 1999. **841**(2): p. 155-164.
97. Kakei, Y., Yamaguchi, I., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N. K., Development of a highly sensitive, quick, and easy LC-ESI-TOF-MS method to quantify nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid in plants. 2009.
98. Weber, G., Neumann, G., Haake, C., Romheld, V., Determination of phytosiderophores by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2001. **928**(2): p. 171-

- 175.
99. Weber, G., N. von Wiren, and H. Hayen, Analysis of iron (II)/iron(III) phytosiderophore complexes by nano-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006. **20**(6): p. 973-980.
 100. Konigsberger, L.C., Konigsberger, E., May, P. M., Hefter, G. T., Complexation of iron(III) and iron(II) by citrate. Implications for iron speciation in blood plasma. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 2000. **78**(3): p. 175-184.
 101. Evans, R.W., Rafique, R., Zarea, A., Rapisarda, C., Cammack, R., Evans, P. J., Porter, J. B., Hider, R. C., Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008. **13**(1): p. 57-74.
 102. Venelinov, T., Arpadjan, S., Karadjova, I., Beattie, J., Properties of the copper(II)-histidine complex obtained after dialysis of human plasma with histidine. *Acta Pharm*, 2006. **56**(1): p. 105-12.
 103. Szabo-Planka, T., Rockenbauer, A., Korecz, L., Nagy, D., An electron spin resonance study of coordination modes in the copper(II)-histamine and copper(II)-L-histidine systems in fluid aqueous solution. *Polyhedron*, 2000. **19**(9): p. 1123-1131.
 104. Sarkar, B. and Y. Wigfield, *Structure of Copper(2)-Histidine Chelate - Question of Involvement of Imidazole Group*. *Journal of Biological Chemistry*, 1967. **242**(23): p. 5572-&.
 105. Lavanant, H., E. Hecquet, and Y. Hoppilliard, *Complexes of L-histidine with Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ studied by electrospray ionization mass spectrometry*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 1999. **187**: p. 11-23.
 106. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Oresic, M., MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *Bmc Bioinformatics*, 2010. **11**: p. 11.
 107. Katajamaa, M., J. Miettinen, and M. Oresic, MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*, 2006. **22**(5): p. 634-636.
 108. Katajamaa, M. and M. Oresic, *Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data*. *Bmc Bioinformatics*, 2005. **6**: p. 12.
 109. Katajamaa, M. and M. Oresic, *Data processing for mass spectrometry-based metabolomics*. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1158**(1-2): p. 318-328.
 110. Taylor, W.R., *The Classification of Amino-Acid Conservation*. *Journal of Theoretical Biology*, 1986. **119**(2): p. 205-&.
 111. Krezel, A. and W. Bal, Studies of zinc(II) and nickel(II) complexes of GSH, GSSG and their analogs shed more light on their biological relevance. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2004. **2**(3-4): p. 293-305.
 112. Garcia-Marco, S., A. Torreblanca, and J.J. Lucena, Chromatographic determination of Fe chelated by ethylenediamine-N-(o-hydroxyphenylacetic)-N '(o-hydroxyphenylacetic)-N '-acid in commercial EDDHA/Fe³⁺ fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. **54**(4): p. 1380-1386.

113. Alvarez-Fernandez, A., Orera, I., Abadia, J., Abadia, A., Determination of synthetic ferric chelates used as fertilizers by liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry in agricultural matrices. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 2007. **18**(1): p. 37-47.
114. Lopez-Rayó, S., Hernandez, D., Lucena, J. J., Escudero, R., Gomez-Gallego, M., Sierra, M. A., Synthesis and Chemical Characterization of the Novel Agronomically Relevant Pentadentate Chelate 2-(2-((2-Hydroxybenzyl)amino)ethylamino)-2-(2-hydroxyphenyl)acetic Acid (DCHA). *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2010. **58**(13): p. 7908-7914.
115. Bienfait, H.F., J. Garcia-Mina, and A.M. Zamareño, *Distribution and secondary effects of EDDHA in some vegetable species*. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2004. **50**(7): p. 1103-1110.
116. Yunta, F., Garcia-Marco, S., Lucena, J. J., Gomez-Gallego, M., Alcazar, R., Sierra, M. A., Chelating agents related to ethylenediamine bis(2-hydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA): Synthesis, characterization, and equilibrium studies of the free ligands and their Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, and Fe³⁺ chelates. *Inorganic Chemistry*, 2003. **42**(17): p. 5412-5421.
117. Abbaspour, A. and M.A. Kamyabi, Characterization and determination of stability constants of copper(II)-L-histidine complexation system by using multivariate curve resolution method of visible spectra and two hard modeling methods in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **512**(2): p. 257-269.
118. Shtyrlin, V.G., Zyavkina, Y. I., Ilakin, V. S., Garipov, R. R., Zakharov, A. V., Structure, stability, and ligand exchange of copper(II) complexes with oxidized glutathione. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005. **99**(6): p. 1335-1346.
119. Sebastiano, R., Simo, C., Mendieta, M. E., Antonioli, P., Citterio, A., Cifuentes, A., Peltre, G., Righetti, P. G., Mass distribution and focusing properties of carrier ampholytes for isoelectric focusing: I. Novel and unexpected results. *Electrophoresis*, 2006. **27**(20): p. 3919-3934.
120. Simo, C., Mendieta, M. E., Antonioli, P., Sebastiano, R., Citterio, A., Cifuentes, A., Peltre, G., Righetti, P. G., Mass distribution, polydispersity and focusing properties of carrier ampholytes for IEF II: pH 4-6 intervals. *Electrophoresis*, 2006. **27**(23): p. 4849-4858.
121. Simo, C., Mendieta, M. E., Antonioli, P., Sebastiano, R., Citterio, A., Cifuentes, A., Righetti, P. G., Mass distribution, polydispersity and focusing properties of carrier ampholytes for IEF. III: pH 2.5-4 intervals. *Electrophoresis*, 2007. **28**(5): p. 715-723.
122. Simo, C., A. Citterio, and P.G. Righetti, Mass distribution, polydispersity and focusing properties of carrier ampholytes for IEF.IV: pH 6-8 intervals. *Electrophoresis*, 2007. **28**(10): p. 1488-1494.
123. Simo, C., A. Citterio, and P.G. Righetti, Mass distribution, polydispersity, and focusing properties of carrier ampholytes for IEF. Part V: pH 9-11 interval. *Electrophoresis*, 2007. **28**(18): p. 3156-3162.
124. Deschamps, P., Zerrouk, N., Chaumeil, J. C., Tomas, A., Martens, T., Nicolis, I., A novel consideration of species distribution of copper(II)/histidine system at physiological pH. *Instrumentation Science & Technology*, 2005. **33**(5): p. 551-

- 564.
125. Mesu, J.G., Visser, T., Soulimani, F., van Faassen, E. E., de Peinder, P., Beale, A. M., Weckhuysen, B. M., New insights into the coordination chemistry and molecular structure of copper(II) histidine complexes in aqueous solutions. *Inorganic Chemistry*, 2006. **45**(5): p. 1960-1971.
 126. Deschamps, P., P.P. Kulkarni, and B. Sarkar, The crystal structure of a novel copper(II) complex with asymmetric ligand derived from (L)-histidine. *Inorganic Chemistry*, 2003. **42**(23): p. 7366-7368.
 127. Bujacz, A., Turek, M., Majzner, W., Lodyga-Chruscinska, E., *X-ray structure of a novel histidine-copper(II) complex*. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 2010. **36**(6): p. 430-435.
 128. Yadav, S.K., Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 2009. **76**(2): p. 167-179.
 129. Speisky, H., Gómez, M., Carrasco-Pozo, C., Pastene, E., Lopez-Alarcón, C., Olea-Azar, C., *Cu(I)-Glutathione complex: A potential source of superoxide radicals generation*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008. **16**(13): p. 6568-6574.
 130. Orera, I., Orduna, J., Abadia, J., Alvarez-Fernandez, A., Electrospray ionization collision-induced dissociation mass spectrometry: a tool to characterize synthetic polyaminocarboxylate ferric chelates used as fertilizers. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 2010. **24**(1): p. 109-119.
 131. Hernandez-Apaolaza, L., P. Barak, and J.J. Lucena, Chromatographic determination of commercial Fe(III) chelates of ethylenediaminetetraacetic acid, ethylenediaminedi(o-hydroxyphenylacetic) acid and ethylenediaminedi(o-hydroxy-p-methylphenylacetic) acid. *Journal Of Chromatography A*, 1997. **789**(1-2): p. 453-460.
 132. Gupta, M.N., S. Jain, and I. Roy, Immobilized metal affinity chromatography without chelating ligands: Purification of soybean trypsin inhibitor on zinc alginate beads. *Biotechnology Progress*, 2002. **18**(1): p. 78-81.
 133. Navarra, G., M. Leone, and V. Militello, *Thermal aggregation of beta-lactoglobulin in presence of metal ions*. *Biophysical Chemistry*, 2007. **131**(1-3): p. 52-61.
 134. Saeseaw, S., J. Shiowatana, and A. Siripinyanond, *Observation of salt-induced beta-lactoglobulin aggregation using sedimentation field-flow fractionation*. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 2006. **386**(6): p. 1681-1688.
 135. Pesek, J.J., M.T. Matyska, and S.M. Fischer, *Improvement of peak shape in aqueous normal phase analysis of anionic metabolites*. *Journal of Separation Science*, 2011. **34**(24): p. 3509-3516.
 136. Nischwitz, V. and B. Michalke, Electrospray ionisation with selected reaction monitoring for the determination of Mn-citrate, Fe-citrate, Cu-citrate and Zn-citrate. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 2009. **23**(15): p. 2338-2346.
 137. Furia, T.E., *CRC Handbook of Food Additives*, 1972.

138. Škeříková, V. and P. Jandera, Effects of the operation parameters on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography separation of phenolic acids on zwitterionic monolithic capillary columns. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(51): p. 7981-7989.
139. Fountain, K.J., Xu, J., Diehl, D. M., Morrison, D., Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 740-751.
140. Van Dorpe, S., Vergote, V., Pezeshki, A., Burvenich, C., Peremans, K., De Spiegeleer, B., *Hydrophilic interaction LC of peptides: Columns comparison and clustering*. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 728-739.
141. Marrubini, G., B.E.C. Mendoza, and G. Massolini, *Separation of purine and pyrimidine bases and nucleosides by hydrophilic interaction chromatography*. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 803-816.
142. Guo, Y. and S. Gaiki, Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal Of Chromatography A*, 2005. **1074**(1-2): p. 71-80.
143. McCalley, D.V. and U.D. Neue, Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1192**(2): p. 225-229.
144. Chauve, B., Guillarme, D., Cléon, P., Veuthey, J.-L., *Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds*. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 752-764.
145. Xie, D., J. Mattusch, and R. Wennrich, Retention of arsenic species on zwitterionic stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 817-825.
146. Dejaegher, B. and Y. Vander Heyden, *HILIC methods in pharmaceutical analysis*. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 698-715.
147. Karatapanis, A.E., Y.C. Fiamegos, and C.D. Stalikas, *A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds*. *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(20): p. 2871-2879.
148. Guo, Y. and S. Gaiki, Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(35): p. 5920-5938.
149. Spagou, K., Tsoukali, H., Raikos, N., Gika, H., Wilson, I. D., Theodoridis, G., Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomic studies. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 716-727.
150. McCalley, D.V., Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(20): p. 3408-3417.
151. <http://www.phenomenex.com/Application/Detail/20593?returnURL=/Kinetex/ApplicationSearch>.

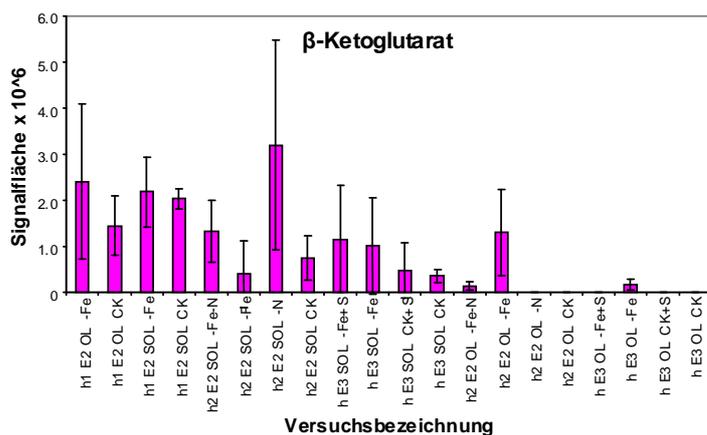
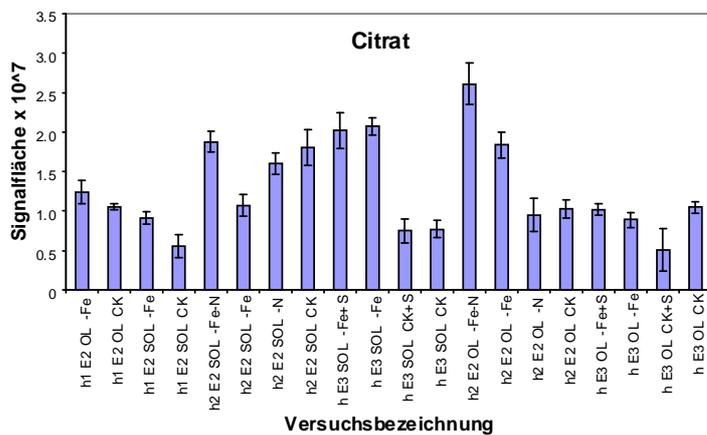
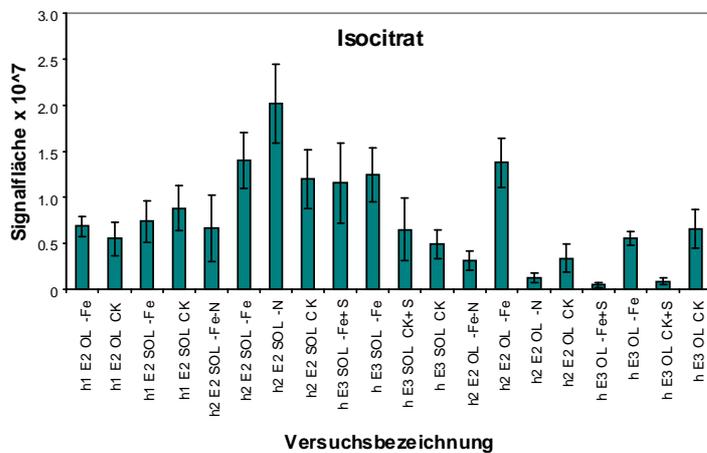
152. Liu, M., Chen, E. X., Ji, R., Semin, D., Stability-indicating hydrophilic interaction liquid chromatography method for highly polar and basic compounds. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1188**(2): p. 255-263.
153. Li, R., Zhang, Y., Lee, C. C., Liu, L., Huang, Y., Hydrophilic interaction chromatography separation mechanisms of tetracyclines on amino-bonded silica column. *Journal of Separation Science*, 2011. **34**(13): p. 1508-1516.
154. Sonnenschein, L. and A. Seubert, *Separation of inorganic anions using a series of sulfobetaine exchangers*. *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(8): p. 1185-1194.
155. Liu, X. and C.A. Pohl, *HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimode column*. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 779-786.
156. Jian, W., Edom, R. W., Xu, Y., Weng, N., Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 681-697.
157. Dell'mour, M., Jaitz, L., Oburger, E., Puschenreiter, M., Koellensperger, G., Hann, S., Hydrophilic interaction LC combined with electrospray MS for highly sensitive analysis of underivatized amino acids in rhizosphere research. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(6-7): p. 911-922.
158. Guo, Y., S. Srinivasan, and S. Gaiki, Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment. *Chromatographia*, 2007. **66**(3-4): p. 223-229.
159. Wikberg, E., Sparrman, T., Viklund, C., Jonsson, T., Irgum, K., A ²H nuclear magnetic resonance study of the state of water in neat silica and zwitterionic stationary phases and its influence on the chromatographic retention characteristics in hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(38): p. 6630-6638.
160. Bocian, S. and B. Buszewski, *Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC – a contribution for a better understanding*. *Journal of Separation Science*, 2012. **35**(10-11): p. 1191-1200.
161. Griko, Y.V., *Energetics of Ca²⁺-EDTA interactions: calorimetric study*. *Biophysical Chemistry*, 1999. **79**(2): p. 117-127.
162. Shtyrlin, V.G., Zyavkina, Y. I., Gilyazetdinov, E. M., Bukharov, M. S., Krutikov, A. A., Garipov, R. R., Mukhtarov, A. S., Zakharov, A. V., Complex formation, chemical exchange, species structure, and stereoselective effects in the copper(II)- L/DL-histidine systems. *Dalton Transactions*, 2012. **41**(4): p. 1216-1228.
163. Altun, Y. and F. Koseoglu, Stability of copper(II), nickel(II) and zinc(II) binary and ternary complexes of histidine, histamine and glycine in aqueous solution. *Journal of Solution Chemistry*, 2005. **34**(2): p. 213-231.
164. Szpunar, J., Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*, 2000. **125**(5): p. 963-988.
165. Hansen, H.R. and S.A. Pergantis, *Investigating the formation of an Sb(v)-citrate complex by HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS(/MS)*. *Journal of*

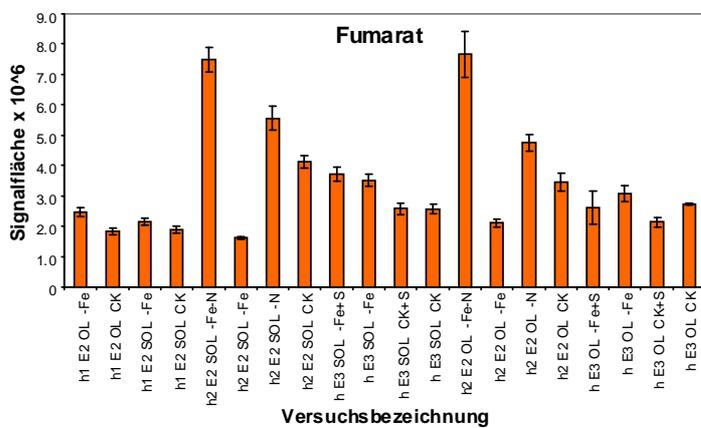
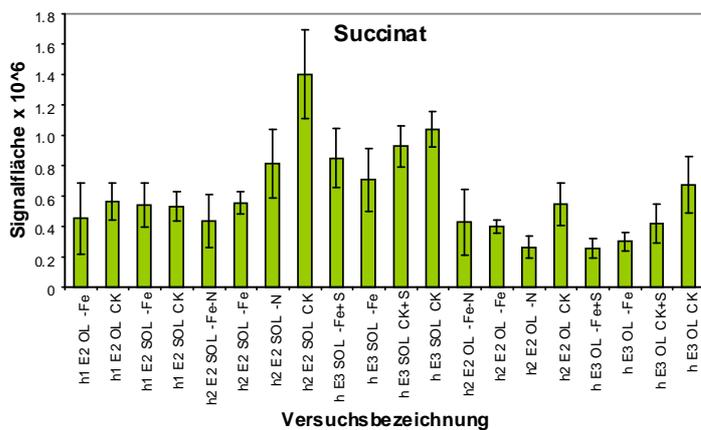
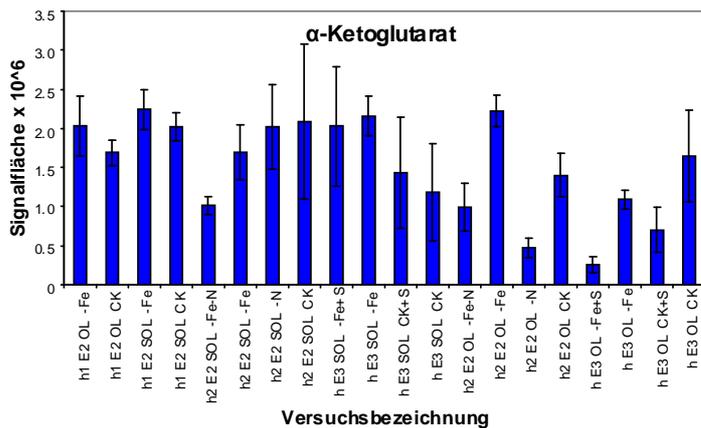
- Analytical Atomic Spectrometry, 2006. **21**(11): p. 1240-1248.
166. Hansen, H.R. and S.A. Pergantis, *Detection of antimony species in citrus juices and drinking water stored in PET containers*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2006. **21**(8): p. 731-733.
167. Vacchina, V., Mari, S., Czernic, P., Marques, L., Pianelli, K., Schaumlöffel, D., Lebrun, M., Lobinski, R., Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. Analytical Chemistry, 2003. **75**(11): p. 2740-2745.
168. Shi, R.L., Weber, G., Koster, J., Reza-Hajirezaei, M., Zou, C. Q., Zhang, F. S., von Wiren, N., Senescence-induced iron mobilization in source leaves of barley (*Hordeum vulgare*) plants. New Phytologist, 2012. **195**(2): p. 372-383.
169. Rellan-Alvarez, R., El-Jendoubi, H., Wohlgemuth, G., Abadia, A., Fiehn, O., Abadia, J., Alvarez-Fernandez, A., Metabolite profile changes in xylem sap and leaf extracts of strategy I plants in response to iron deficiency and resupply. Frontiers in plant science, 2011. **2**.
170. Marschner, H., V. Romheld, and M. Kissel, *DIFFERENT STRATEGIES IN HIGHER-PLANTS IN MOBILIZATION AND UPTAKE OF IRON*. Journal of Plant Nutrition, 1986. **9**(3-7): p. 695-713.
171. Zuchi, S., S. Cesco, and S. Astolfi, *High S supply improves Fe accumulation in durum wheat plants grown under Fe limitation*. Environmental and Experimental Botany, 2012. **77**: p. 25-32.
172. Inoue, H., Takahashi, M., Kobayashi, T., Suzuki, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N. K., Identification and localisation of the rice nicotianamine aminotransferase gene OsNAAT1 expression suggests the site of phytosiderophore synthesis in rice. Plant Molecular Biology, 2008. **66**(1-2): p. 193-203.
173. Aciksoz, S.B., Ozturk, L., Gokmen, O. O., Romheld, V., Cakmak, I., Effect of nitrogen on root release of phytosiderophores and root uptake of Fe(III)-phytosiderophore in Fe-deficient wheat plants. Physiologia Plantarum, 2011. **142**(3): p. 287-296.
174. Neelam, K., Tiwari, V. K., Rawat, N., Tripathi, S. K., Randhawa, G. S., Dhaliwal, H. S., Identification of Aegilops species with higher production of phytosiderophore and iron and zinc uptake under micronutrient-sufficient and -deficient conditions. Plant Genetic Resources-Characterization and Utilization, 2010. **8**(2): p. 132-141.
175. Gomez-Galera, S., Sudhakar, D., Pelacho, A. M., Capell, T., Christou, P., Constitutive expression of a barley Fe phytosiderophore transporter increases alkaline soil tolerance and results in iron partitioning between vegetative and storage tissues under stress. Plant Physiology and Biochemistry, 2012. **53**: p. 46-53.
176. Tsednee, M., Mak, Y. W., Chen, Y. R., Yeh, K. C., A sensitive LC-ESI-Q-TOF-MS method reveals novel phytosiderophores and phytosiderophore-iron complexes in barley. New Phytologist, 2012. **195**(4): p. 951-961.
177. Astolfi, S., Zuchi, S., Hubberten, H. M., Pinton, R., Hoefgen, R., Supply of sulphur to S-deficient young barley seedlings restores their capability to cope

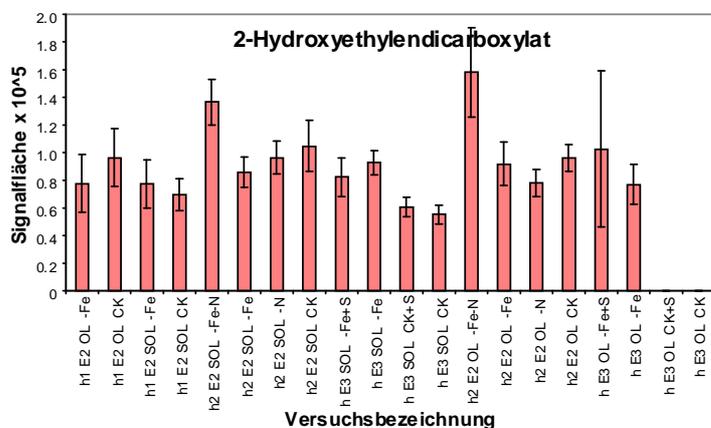
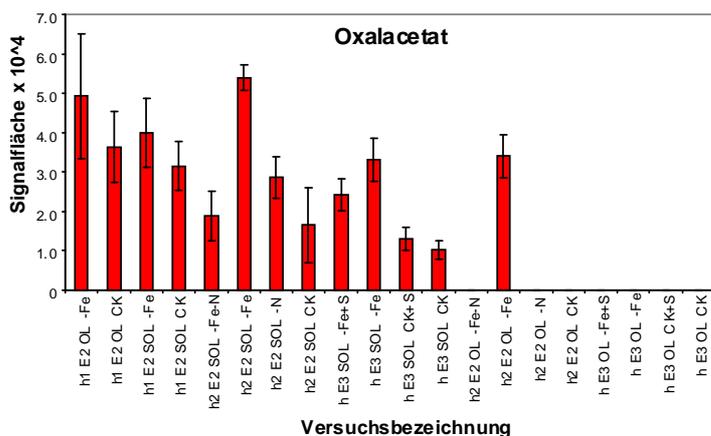
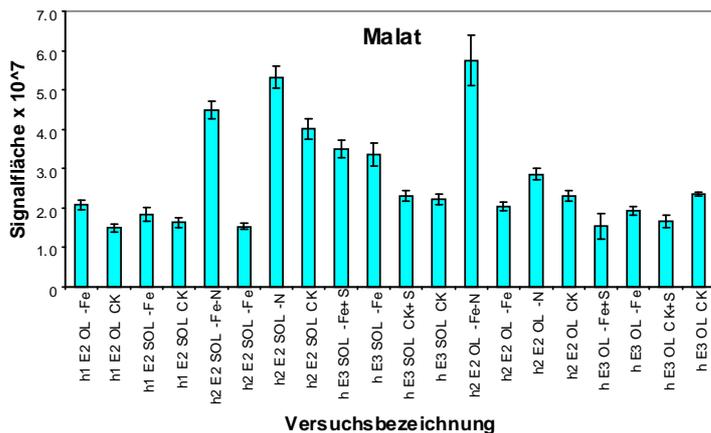
- with iron shortage. *Journal of Experimental Botany*, 2010. **61**(3): p. 799-806.
178. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M., KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*. **40**(D1): p. D109-D114.
179. KEGG: Kyoto Eyclopedia of Genes and GenomesLigand-Database, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
180. Carvalhais, L.C., Dennis, P. G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M. R., Borriss, R., von Wiren, N., Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2011. **174**(1): p. 3-11.
181. Fan, T.W.M., Lane, A. N., Pedler, J., Crowley, D., Higashi, R. M., Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 1997. **251**(1): p. 57-68.

9 Anhang

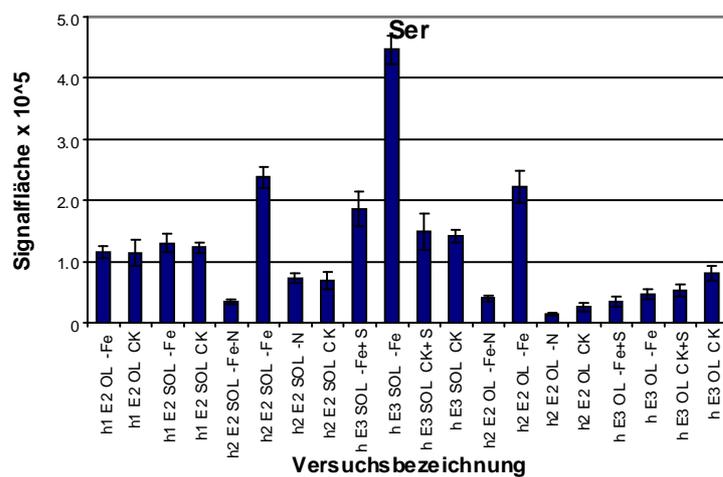
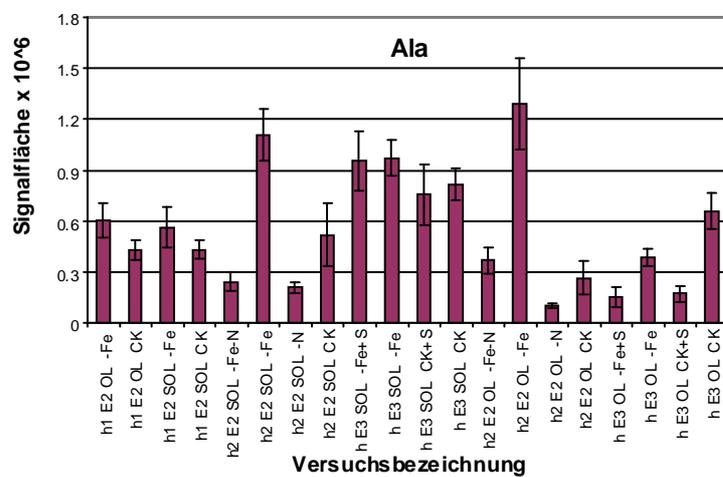
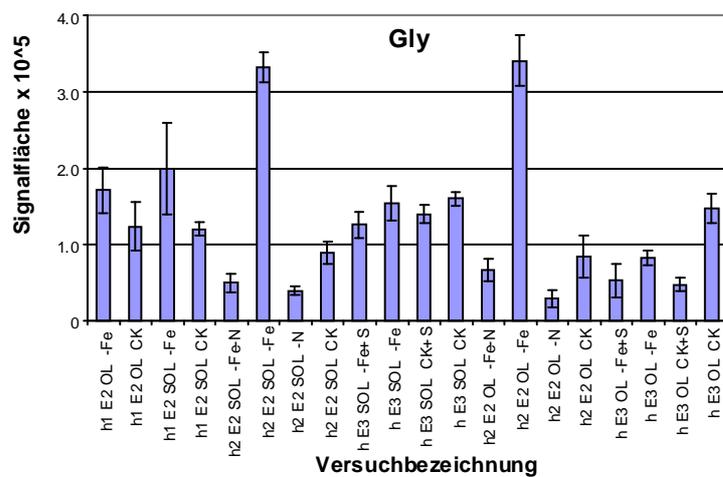
9.1 Metabolite des Citratzyklus

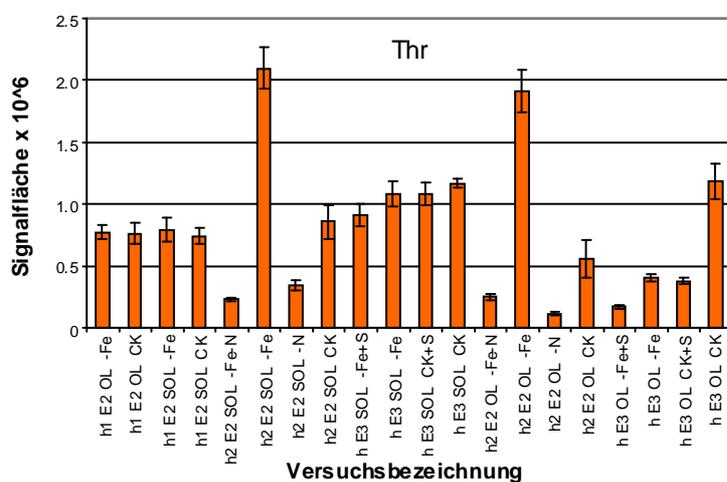
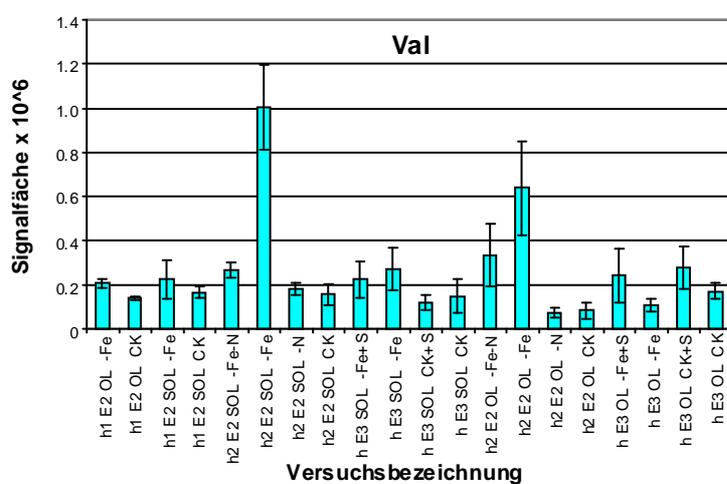
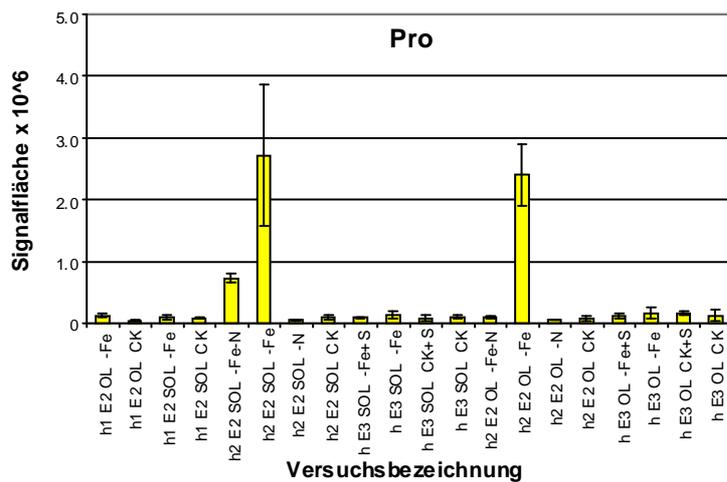


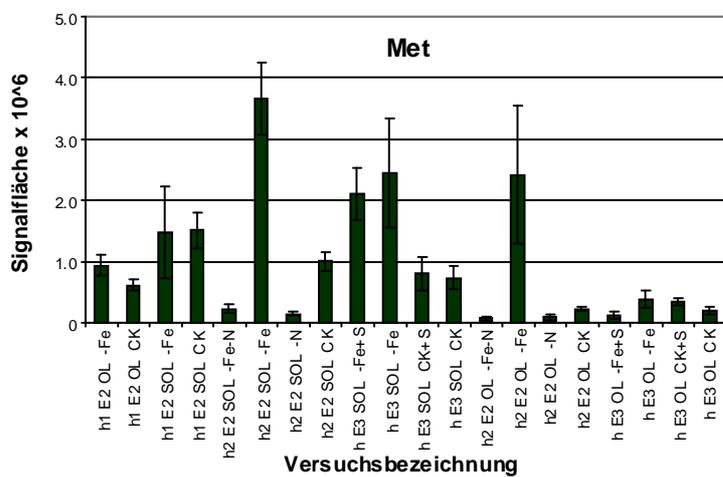
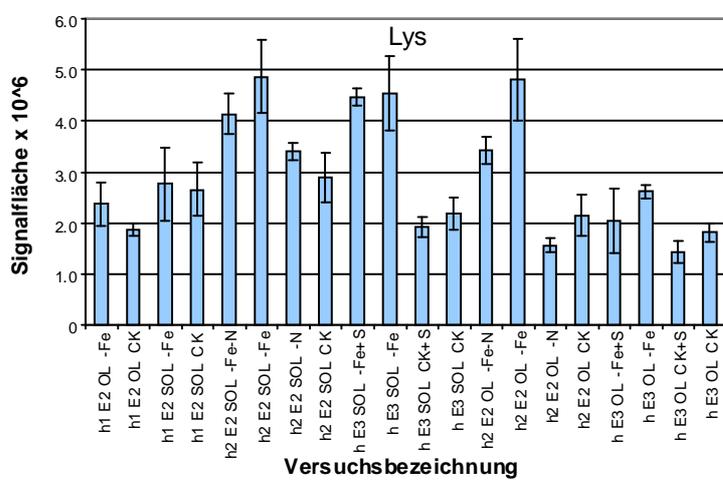
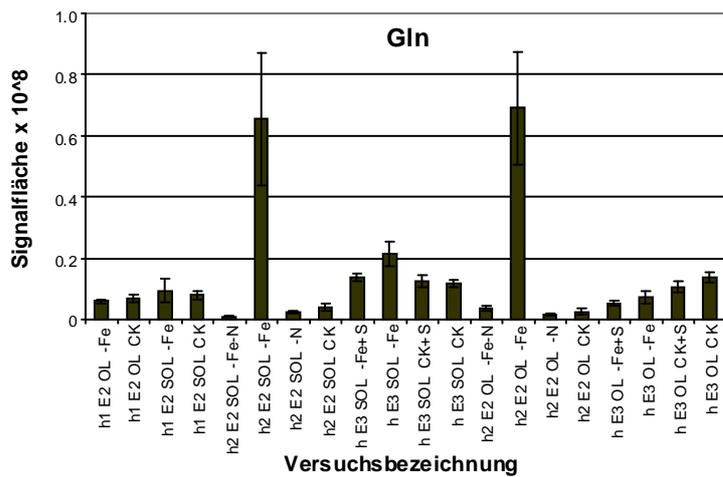


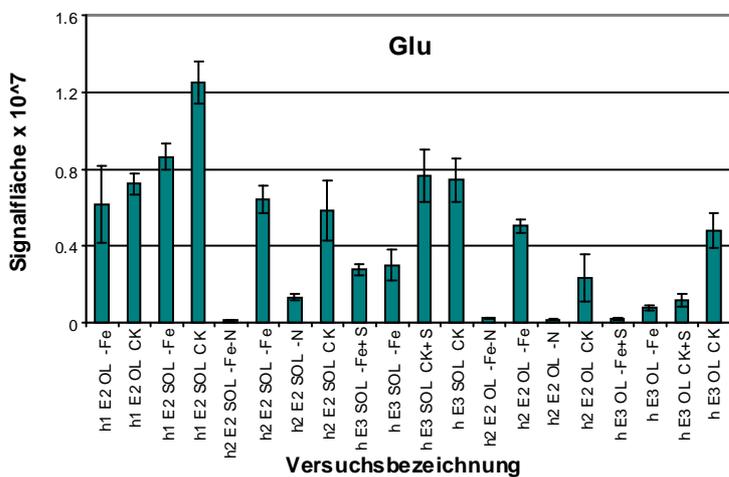
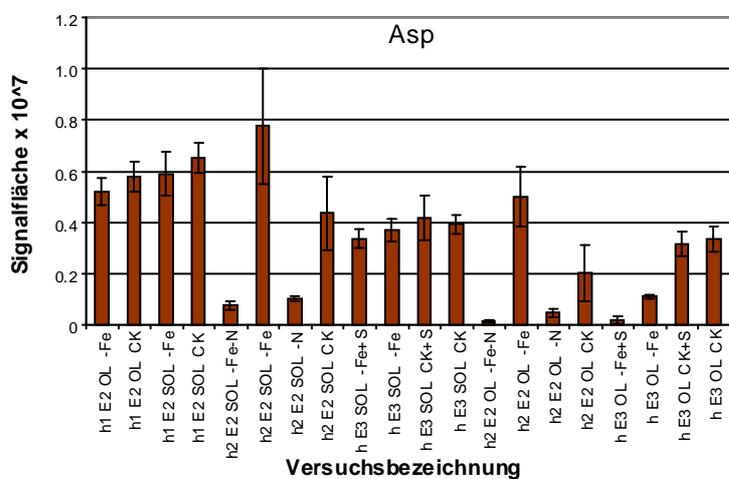
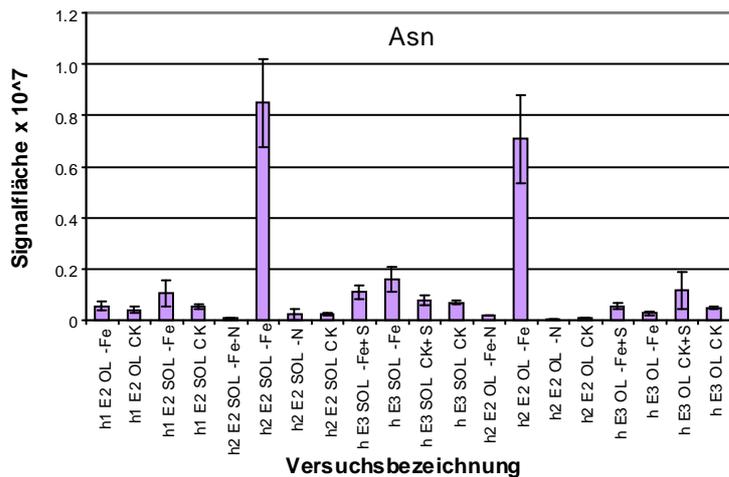


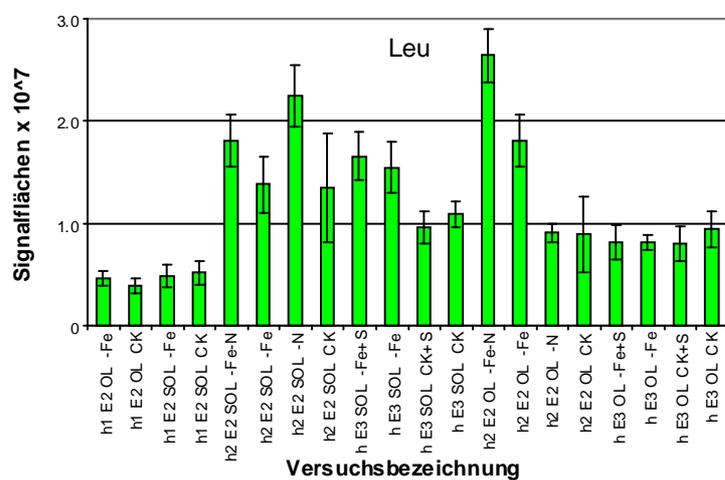
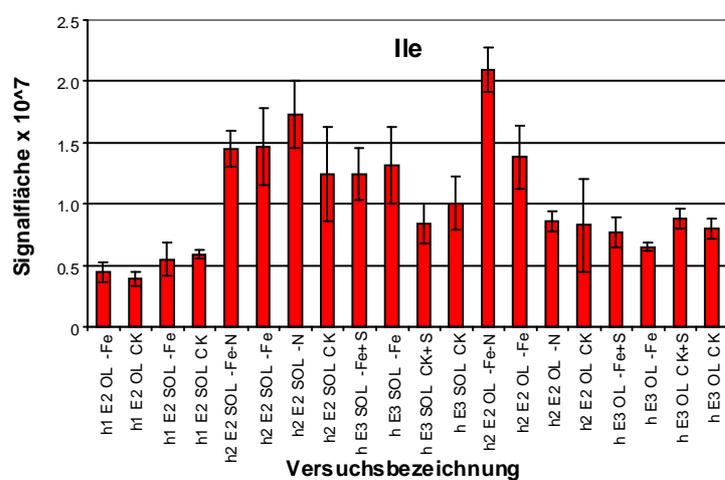
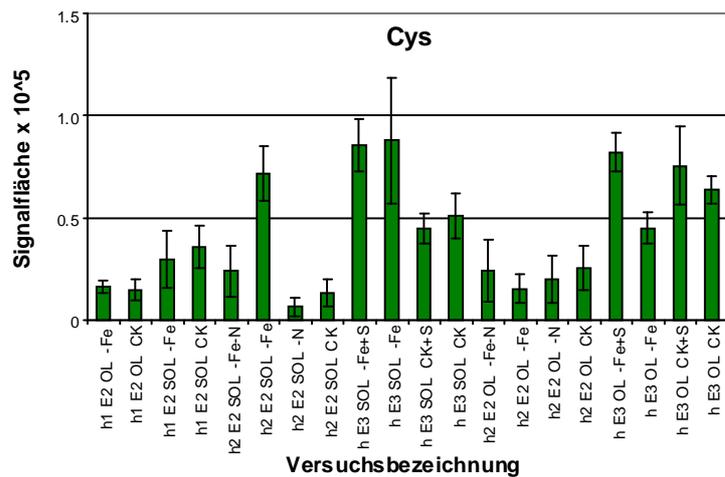
9.2 Aminosäuren

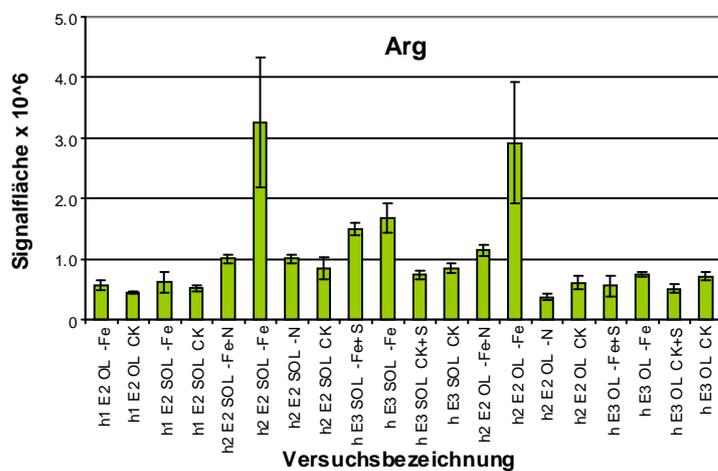
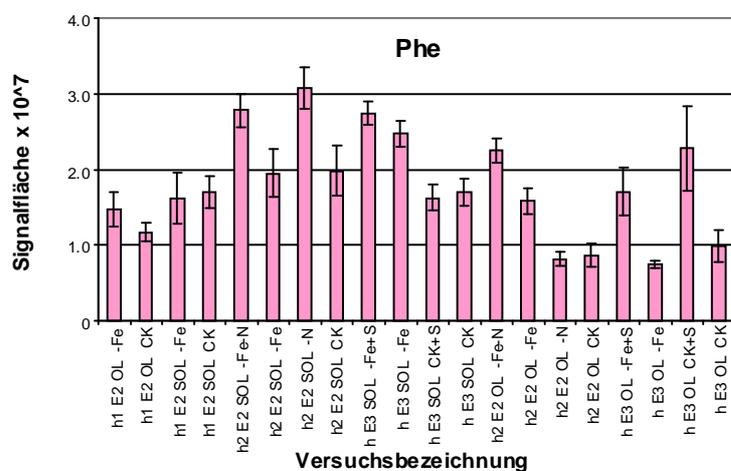
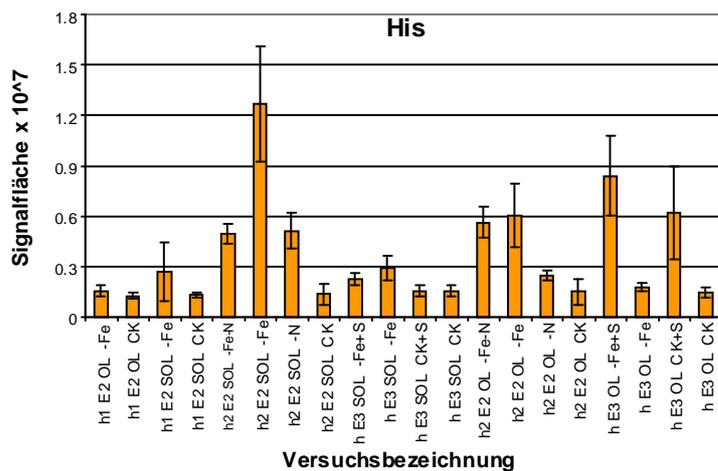


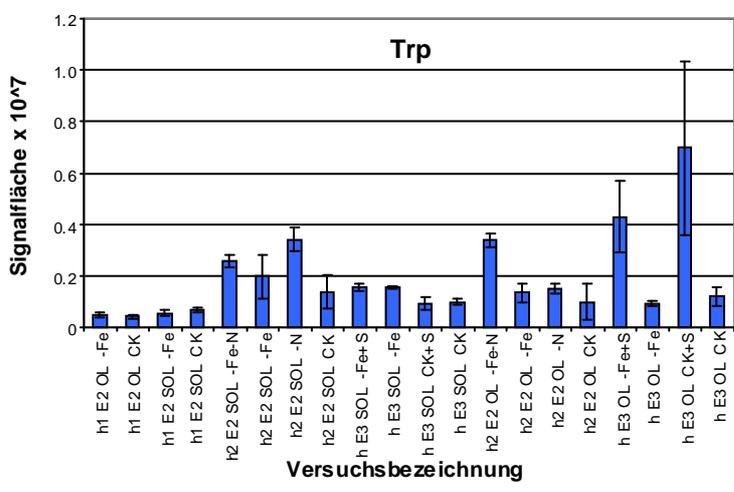
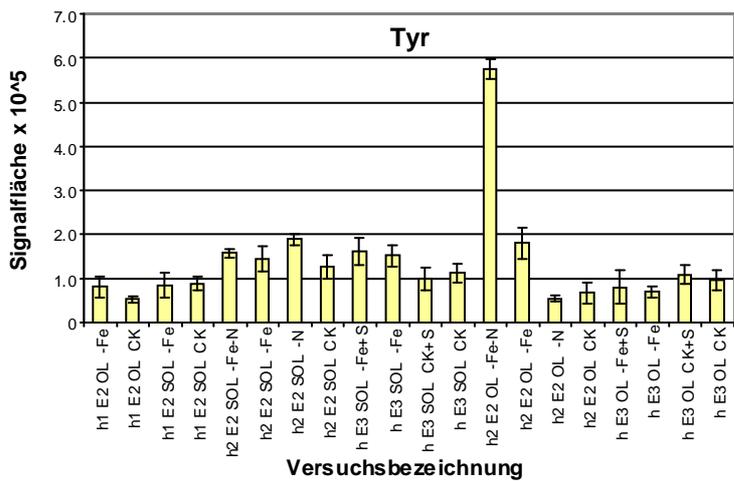




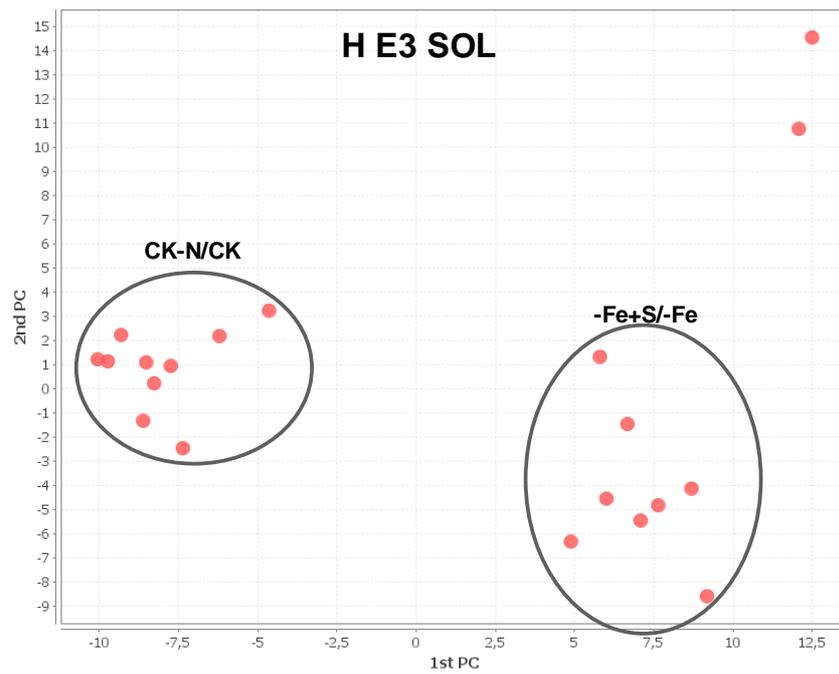
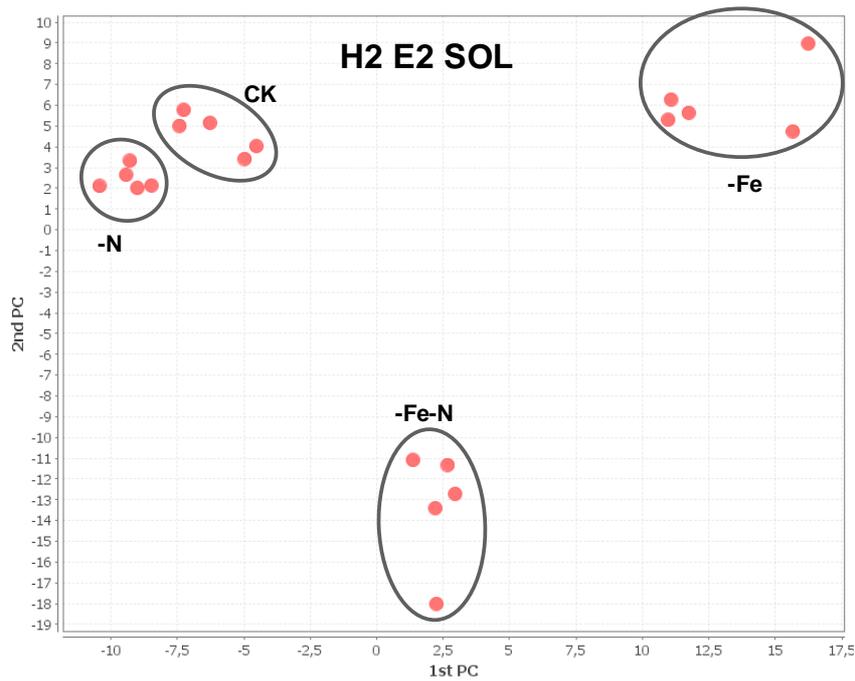


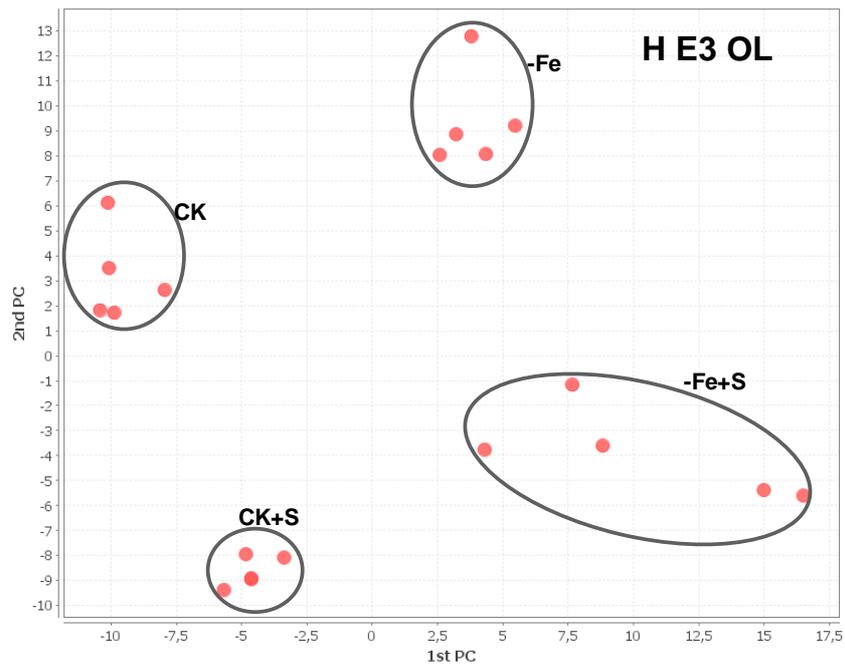
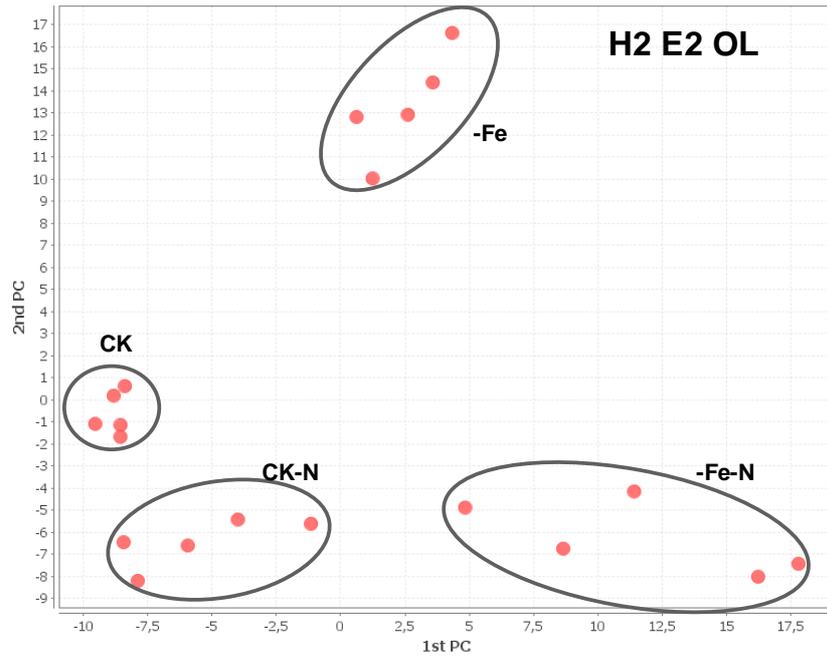




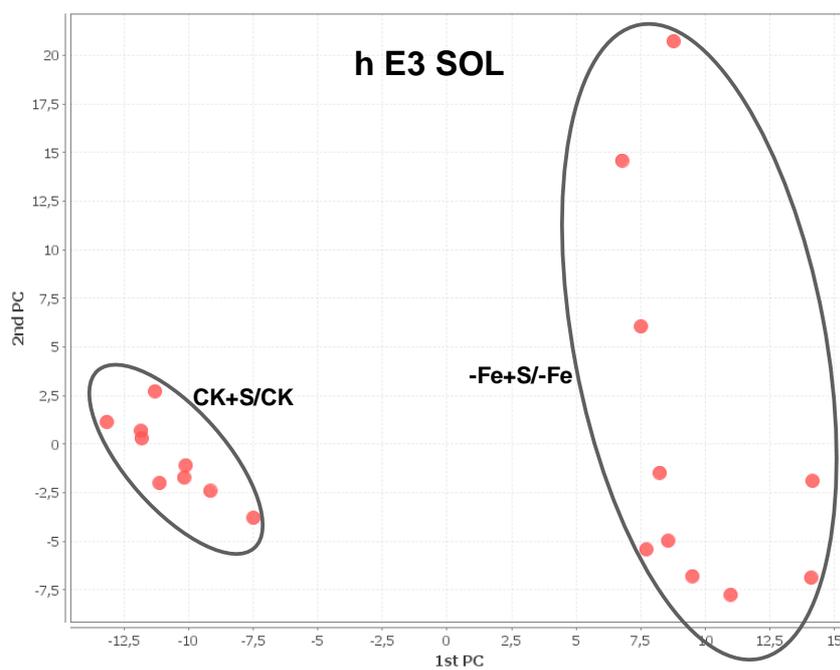
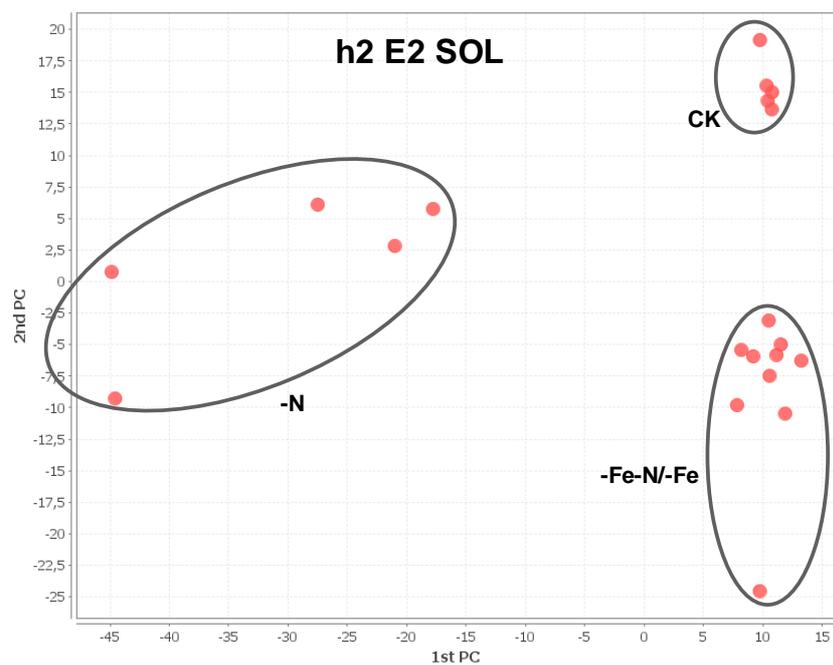


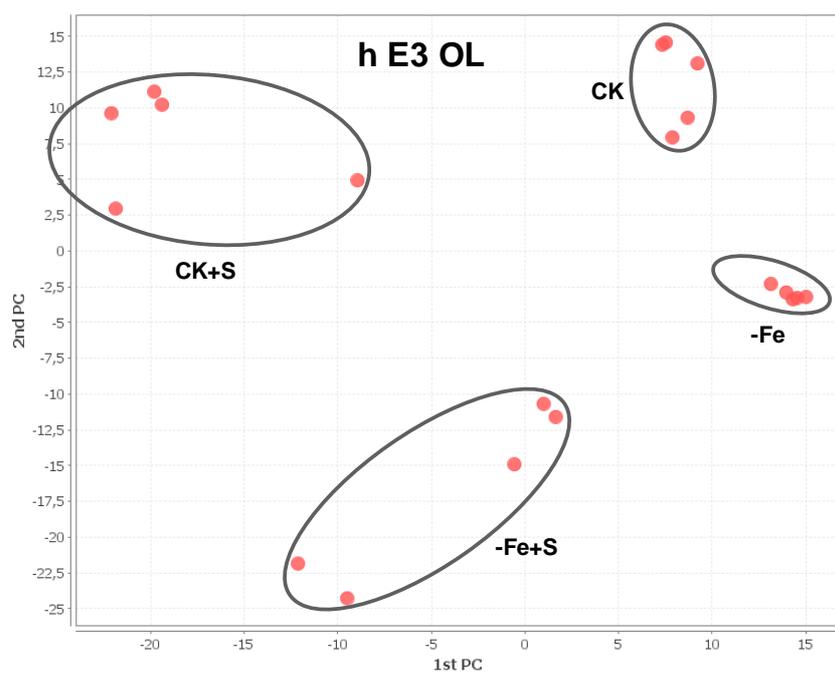
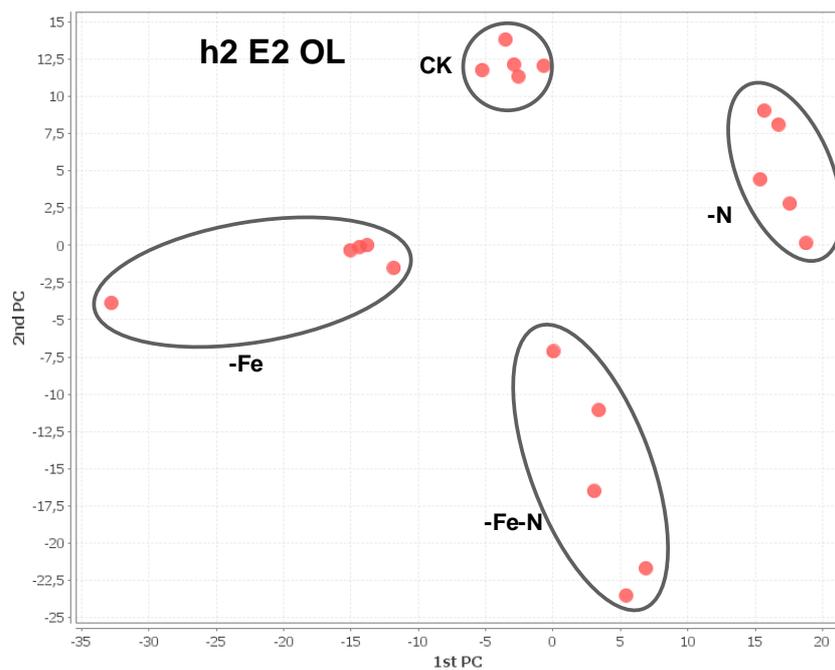
9.3 PCA-Analysen des Massenbereichs 65-175 m/z





9.4 PCA-Analysen des Massenbereichs 450-1000





Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Sickmann für die Möglichkeit die Arbeiten am ISAS durchzuführen, die Nutzung der Geräteausstattung des ISAS und die fachliche Unterstützung. Besonders dankbar bin ich für die späte Übernahme der Betreuung als Doktorvater.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. von Wirén, dem Leiter der Abteilung Physiologie und Zellbiologie des IPK-Gatersleben, für die Zusammenarbeit in diesem Kooperationsprojekt und für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

Mein spezieller Dank gilt außerdem Herrn Dr. Weber für die fachliche Betreuung der Arbeiten, für seinen Rat, für die Unterstützung, die wertvollen Diskussionen und Anregungen über die gesamte Zeit, sowie die Korrekturen der Doktorarbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Finanzierung dieses Forschungsprojektes.

Natürlich danke ich auch meinen Kollegen am ISAS (auch den ehemaligen ISAS-Mitarbeitern) für die fachliche Unterstützung, Korrekturarbeiten und emotionalen Beistand während meiner Zeit am ISAS. Das nette Arbeitsklima unter den Kollegen, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, danke dafür.

Mein besonderer Dank gilt den Menschen, die mich neben der Arbeit unterstützt haben, mir Ablenkung geboten haben und mich aufgebaut haben. Besonders nennen möchte ich dabei Wibke, Raphael, Michael und Beate. Euch möchte ich auf keinen Fall missen! Aber auch allen anderen möchte ich danken, die mir beigestanden haben und mich (vor allem im sportlichen Rahmen) regelmäßig abgelenkt haben.

Last but not least danke ich ganz herzlich meiner Familie, die mich über die ganze Zeit unterstützt hat und immer an mich geglaubt hat. Ohne euch hätte ich längst aufgegeben!

Eidesstattliche Erklärungen

§ 8 (2) 4.

Ich erkläre, dass beim Verfassen der eingereichten Dissertation keine anderen als die angegebenen Personen mitgewirkt haben, nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und übernommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

§ 8 (2) 6.

Ich erkläre, dass ich bisher keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Dortmund, den 19.06.2013