

## UEBER DEN ABBAU VON FLAVONOLEN DURCH PFLANZLICHE PEROXIDASEN\*

WOLFGANG HÖSEL, GUDRUN FREY and WOLFGANG BARZ

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Universität, 44 Münster/Westfalen, Deutschland

(Eingegangen 26 Juni 1974)

**Key Word Index**—Plant peroxidases; flavonols; degradation products; isoelectric focusing; isoenzymes; IAA oxidase.

**Abstract**—Peroxidases have been shown to catalyse the degradation of flavonols via 2,3-dihydroxyflavanones to benzoic acids. Incubation of (U- $^{14}\text{C}$ )-kaempferol with pure horseradish peroxidase leads to the same reaction products (2,3,4,5,7,4'-pentahydroxyflavanone, *p*-hydroxybenzoic acid,  $^{14}\text{CO}_2$ , several polar, water soluble catabolites) as given by enzyme preparations from various plant species. Further reactions of flavonols and their glycosides with peroxidases are discussed. All peroxidase isoenzymes of *Sinapis alba* and *Cicer arietinum*, obtained by isoelectric focusing, have been shown to degrade flavonols at the same rate. The peroxidase catalysed degradation of polyphenols is discussed in relation to IAA oxidase.

**Zusammenfassung**—Für den früher mit Enzymen aus höheren Pflanzen beschriebenen Abbau von Flavonolen über 2,3-Dihydroxyflavanone zu Benzoesäuren wurden Peroxidasen als verantwortliche Enzyme erkannt. Beim Abbau von (U- $^{14}\text{C}$ )-Kämpferol mit reiner Meerrettich-Peroxidase entstehen dieselben Produkte (2,3,5,7,4'-Pentahydroxyflavanon, *p*-Hydroxybenzoesäure,  $^{14}\text{CO}_2$  und mehrere polare, wasserlösliche Katabolite) wie mit Enzymen aus zahlreichen höheren Pflanzen. Weitere Reaktionsmöglichkeiten von Flavonolen und ihren Glykosiden mit Peroxidasen werden besprochen. Alle durch isoelektrische Fokussierung erhaltenen Peroxidase-Isoenzyme aus *Sinapis alba* und *Cicer arietinum* besitzen vergleichbare Fähigkeiten zum Flavonolabbau. Der Peroxidase-katalysierte Polyphenolabbau wird im Zusammenhang mit der IAA-Oxidase diskutiert.

### EINLEITUNG

Flavonole sind in höheren Pflanzen stoffwechselaktive Verbindungen [1], die fortlaufendem Umsatz und Abbau unterliegen. Für die katabolen Stoffwechselwege der Flavonole Kämpferol und Quercetin können durch Arbeiten mit pflanzlichen Enzymen [2, 3] wie auch mit Zellsuspensionskulturen höherer Pflanzen [3] genauere Angaben gemacht werden. Der im zellfreien System untersuchte Abbau führt über 2,3-Dihydroxyflavanone [2] zu einer Spaltung des Flavonoidgerüsts, wobei aus dem B-Ring die entsprechenden Benzoesäuren entstehen [3]. Diese enzymatische Aktivität für Flavonol-Umsetzung ("fu-Enzymaktivität") ist im Pflanzenreich offensichtlich weit verbreitet, da sie in allen bisher untersuchten Pflanzen [4] nachgewiesen wurde. Offensichtlich gleichartiger Abbau von Flavonolen erfolgte in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen (*Cicer arietinum*,

*Glycine max*, *Phaseolus aureus*, *Petroselinum hortense*). Neben den Benzoesäuren aus dem B-Ring wurden bei Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Flavonolen beträchtliche Mengen an  $^{14}\text{CO}_2$  freigesetzt [3]. Die weite Verbreitung der fu-Enzymaktivität in Pflanzen, verschiedene chemische Aspekte sowie zahlreiche Hinweise auf die Umsetzung von phenolischen Substraten mit pflanzlichen Peroxidasen [5–10], veranlaßten uns, den von uns nachgewiesenen Abbau der Flavonole auf die Einwirkung von Peroxidasen zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Identität von fu-Enzymaktivität mit Peroxidasen sowie über die Auftrennung von Peroxidase-Isoenzymen und deren Fähigkeit zum Flavonolabbau.

### ERGEBNISSE

#### Identität von fu-Enzym und Peroxidase

Incubiert man Flavonolglyka, z. B. Kämpferol (Kurve A in Abb. 1) mit Meerrettich-Peroxidase (abgekürzt HRP) in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , so können im Bereich von 200–450 nm genau die

\* Teilweise aus der Diplomarbeit von G. Frey, Universität Freiburg/Br. (1973). Auszugsweise vorgetragen auf der Herbsttagung in Innsbruck, 2.–5.10.73, vergl. Hoppe-Seyler's (1973) *Z. Physiol. Chem.* **354**, 1203.

Änderungen der UV-Absorption beobachtet werden, die für die Inkubation von Flavonolaglyka mit fu-Enzym beschrieben wurden [2, 3]. In einer ersten Reaktion entsteht das 2,3,5,7,4'-Pentahydroxyflavanon (Kurve B in Abb. 1), das im weiteren Inkubationsverlauf weiter umgesetzt wird (C, D in Abb. 1). Die Umwandlung von Kämpferol in das 2,3,5,7,4'-Pentahydroxyflavanon verläuft dabei wie bei der fu-enzymatischen Reaktion wieder wesentlich schneller als dessen weitere Umsetzung. 1  $\mu$ g HRP setzte in 1 min 0,5  $\mu$ mol Kämpferol in Gegenwart von 0,4  $\mu$ mol  $H_2O_2$  vollständig in das 2,3,5,7,4'-Pentahydroxyflavanon um, das seinerseits in demselben Inkubationsansatz innerhalb von vier Stunden fast vollständig weiter umgesetzt wurde. Durch Erhöhung der  $H_2O_2$  Konzentration konnte die Reaktionsgeschwindigkeit weiter gesteigert werden. Bei der chromatographischen Untersuchung des Inkubationsansatzes am Ende der Inkubation (D in Abb. 1) ist als Hauptabbauprodukt des B-Rings wieder die entsprechende Benzoesäure [3], bei Kämpferol die *p*-Hydroxybenzoesäure, nachweisbar. Wird 2,3,5,7,4'-Pentahydroxyflavanon (isoliert und gereinigt nach [2]) mit HRP and  $H_2O_2$  versetzt, so zeigt sich derselbe Verlauf wie in Abbildung 1 (B, C, D), der bereits für das fu-Enzym beschrieben wurde [2]. Eine Produktanalyse ergab auch in diesem Fall identische Ergebnisse.

Die Umwandlung der Flavonole durch fu-Enzym aus Pflanzen sowie durch HRP findet nur in Gegenwart von  $H_2O_2$  statt. Katalase hemmt jeweils schon in geringer Konzentration (1  $\mu$ g/ml) die Flavonol-Umsetzungen vollständig. Die früher beschriebenen fu-enzymatischen Reaktionen, die

ohne  $H_2O_2$  durchgeführt worden waren [2, 3], können durch  $H_2O_2$ -Zusatz stark gesteigert werden und ebenso kann der Verlust an fu-enzymatischer Aktivität nach Ammonsulfatfällung, bzw. nach Sephadex G 25 Filtration des Proteins [11] durch Zusatz von  $H_2O_2$  wieder vollständig aufgehoben werden. Die genannten Gründe sprechen dafür, daß die enzymatische Umwandlung der Flavonole durch Peroxidasen katalysiert wird. Quantitative Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Reaktionsgeschwindigkeit von  $H_2O_2$ -Gehalt des Inkubationsansatzes abhängt.  $H_2O_2$  aber in einer geringeren als der stöchiometrisch notwendigen Menge für die Flavonolumsetzung benötigt wird.

#### *Fehlen der optischen Aktivität des 2,3,5,7,4'-Pentahydroxyflavanon*

Bei der Umwandlung der Flavonole in die 2,3-Dihydroxyflavanone [2] entstehen an den Positionen 2 und 3 des Flavanongerüsts zwei asymmetrische Kohlenstoffatome. Im Falle einer stereospezifischen Reaktion sollte eine optische Aktivität des entstehenden Produktes meßbar sein. Gereinigtes 2,3,5,7,4'-Pentahydroxyflavanon zeigte jedoch keinerlei optische Aktivität. Diese Tatsache ist nicht überraschend, da Reaktionen von Peroxidasen nicht stereospezifisch erfolgen [12] und andererseits auch die zyklische Halbketalstruktur der 2,3-Dihydroxyflavanone leicht racemisieren sollte.

#### *Abbau von (U- $^{14}C$ )-Kämpferol durch Meerrettichperoxidase*

Bei Inkubation von (U- $^{14}C$ )-Kämpferol [3] mit HRP und  $H_2O_2$  konnte am Ende der Inkubation (entsprechend Spektrum D in Abb. 1) folgende Radioaktivitätsverteilung gemessen werden:

(a) Ca 1% der Radioaktivität wurde im Verlauf der Inkubation als  $^{14}CO_2$  freigesetzt.

(b) Ungefähr 30% der Radioaktivität ließen sich durch Äther aus dem Inkubationsansatz extrahieren, die Hauptmenge der Radioaktivität war dabei in *p*-Hydroxybenzoesäure enthalten. Außerdem war bei Dünnschichtchromatographie des Ätherextraktes eine zweite, stärker polare Substanz, allerdings in bedeutend geringerer Menge zu beobachten.

(c) Die Radioaktivität des wässrigen Rückstands war in mehreren stark polaren Substanzen

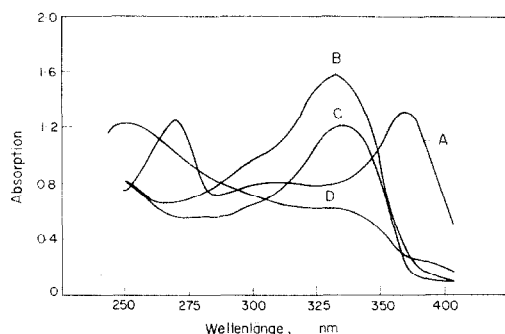


Abb. 1. Verlauf der UV-Absorption bei der Inkubation von Kämpferol mit Meerrettich-Peroxidase und  $H_2O_2$  in Phosphatpuffer, pH 7,5. (A) bei Beginn, (B) nach 1 min, (C) nach 1 Stunde, (D) nach 4 Stunden.

enthalten, die offensichtlich keine phenolische Struktur mehr besaßen. Die Strukturen dieser Substanzen, die aus dem A-Ring bzw. aus dem heterozyklischen Teil des Flavonoidgerüsts stammen, sind noch unbekannt, an ihrer Aufklärung wird gearbeitet.

Der Abbau von ( $U-^{14}C$ )-Kämpferol mit Peroxidasen aus der Kichererbse verlief genauso wie mit HRP vorstehend beschrieben.

#### Weitere Reaktionen von Flavonolen mit Peroxidasen

Außer den oben beschriebenen Reaktionen bewirken Peroxidasen in Gegenwart von  $H_2O_2$  mit Flavonolen offensichtlich auch noch weitere Umwandlungen. So erfolgt beim Abbau von Quercetin wahrscheinlich ein weiterer Angriff an der *o*-Dihydroxystruktur des B-Rings, denn Protocatechusäure ist als Abbauprodukt nicht oder nur in Spuren nachweisbar. Auf welcher Stufe des Abbaus eine Reaktion am B-Ring erfolgt, ist unklar, denn auch Protocatechusäure selbst kann mit Peroxidase und  $H_2O_2$  reagieren [13].

Die Bildung der 2,3-Dihydroxyflavone erfolgt nur, wenn die 3-Hydroxylgruppe der Flavonole frei vorliegt. Flavonol-3-Glykoside zeigen dagegen diese Reaktion nicht [3, 11]. Inkubiert man jedoch Flavonol-3-Glykoside mit HRP in Gegenwart von  $H_2O_2$ , so zeigt sich, daß auch sie umgewandelt werden, denn es erfolgen deutliche Veränderungen in ihrem UV-Spektrum, wobei vor allem das Maximum bei 350 nm fast vollständig verschwindet. Dabei werden Quercetin-3-Glykoside, z. B. Rutin, bedeutend schneller umgesetzt als Kämpferol-3-Glykoside, dies deutet wiederum auf einen Angriff der Peroxidase an der *o*-Dihydroxystruktur hin. Die Reaktionen der Flavonol-3-Glykoside laufen im Gegensatz zu denen der Flavonol-Aglyka um Größenordnungen langsamer ab und es sind auch bedeutend höhere Konzentrationen an Peroxidase und  $H_2O_2$  notwendig.

#### Flavonolumsetzung mit Peroxidase-Isoenzymen

Nachdem der Abbau von Flavonolen über 2,3-Dihydroxyflavone durch Peroxidase bewiesen war, haben wir durch Auftrennung von pflanzlichen Peroxidasen in die Isoenzyme festgestellt, ob diese Reaktion eine generelle Fähigkeit von Peroxidasen ist oder ob dazu nur einzelne Isoenzyme befähigt sind; eine solche Spezifität konnte

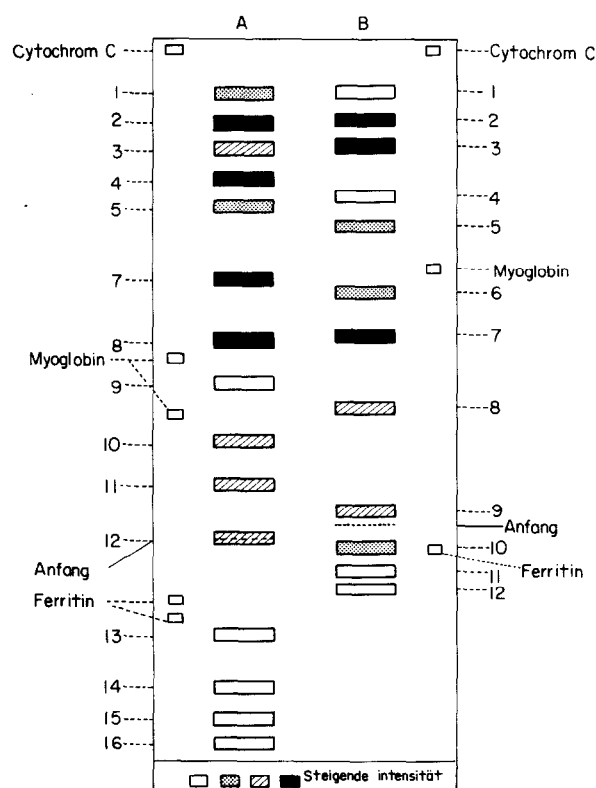


Abb. 2. Schematische Darstellung der Peroxidase-Isoenzyme aus *Sinapis alba* Keimlingen (A) und Zellkulturen von *Cicer arietinum* (B), aufgetrennt durch isoelektrische Fokussierung auf Sephadex G 75 beschichteten Gelplatten. Die Auftrennungen erfolgten in zwei voneinander unabhängigen Läufen, die Detektion erfolgte jeweils mit *o*-Dianisidin.

bei den Umwandlungen von Scopoletin [7] und Ferulasäure [8] durch Peroxidase Isoenzyme von *Nicotiana tabacum* Zellkulturen gezeigt werden. Die Peroxidase-Isoenzyme von *Sinapis alba* [14] sowie von Zellsuspensionskulturen von *Cicer arietinum* [3] wurden durch isoelektrische Fokussierung an Sephadex G 75 superfine beschichteten Gelplatten [15] aufgetrennt. Die Detektion erfolgte einerseits direkt auf der Platte mit *o*-Dianisidin (eine schematische Darstellung der Peroxidase Isoenzymbanden aus den beiden untersuchten Pflanzen zeigt Abb. 2), zum anderen wurden die aufgetrennten Isoenzyme mit Puffer eluiert und nach Entfernung der Ampholine die Aktivität für *o*-Dianisidin und für Kämpferol gemessen. Es zeigte sich, daß alle mit *o*-Dianisidin aktiven Peroxidase-Isoenzyme auch mit Kämpferol als Substrat aktiv waren, wobei sich die

Tabelle 1. Vergleich der spezifischen—sowie der Gesamtaktivität der in Abb. 2 dargestellten Peroxidase-Isoenzyme von *Sinapis alba* Keimlingen (A) und *Cicer arietinum* Zellkulturen (B); Kämpferol und *o*-Dianisidin dienen als Substrate. Die Nummerierung der Isoenzyme entspricht der in Abb. 2

Protein (Isoenzyme)	Enzymaktivität mit Kämpferol		Enzymaktivität mit <i>o</i> -Dianisidin	
	Spez. Akt. ( $\mu\text{mol/l min} \times \text{mg}$ )	Gesamtakt. ( $\mu\text{mol/ml}$ )	Spez. Akt. (U/l min $\times$ mg)	Gesamtakt. (U/ml)
Keimlinge von <i>Sinapis alba</i> (a)				
Ausgangsrohsaft	37,4	260	1300	8800
2	12,5	15	512	615
4	10,1	21	393	825
7	5,3	10,5	89	177
8	7,9	16,5	175	368
10	0,8	1,5	50	45
11	1,7	2,65	6	10
12	1,1	1,9	3,5	6
Zellsuspensionskulturen von <i>Cicer arietinum</i> (b)				
Ausgangsrohsaft	253	760	9700	29000
2	32	32	514	514
3	21	44	619	1300
5	1,5	2,8	31	58
6	1,6	2,8	6,2	11
7	56,5	130	210	4900
8	8,6	8,6	180	180
9	3,3	5,6	33,5	57
10	1,4	3,6	14	36

Isoenzyme in ihrer relativen Aktivität gegen *o*-Dianisidin und Kämpferol gleich verhielten, daß heißt hohe Aktivität bei *o*-Dianisidin war mit hoher Aktivität bei Kämpferol gekoppelt und umgekehrt (Tabelle 1).

Man kann also schließen, daß alle Peroxidase-Isoenzyme (zumindest die aus *S. alba* und *C. arietinum*) die Fähigkeit zum Flavonolabbau besitzen.

#### Verteilung der Peroxidase-Aktivität in der Kichererbsenpflanze

Im Hinblick auf die ubiquitäre Verteilung von Peroxidasen im Pflanzenreich erscheint es vernünftig, daß die Flavonolumwandelnde Enzymaktivität in allen früher untersuchten Pflanzen nachgewiesen wurde [4]. Die früher in den verschiedenen Organen der Kichererbsenpflanze gemessene stark unterschiedliche Verteilung dieser Enzymaktivität [4] war jedoch mit dem generellen Vorkommen von Peroxidase in allen Pflanzenteilen [16] nicht zu vereinbaren. Eine erneute Bestimmung, diesmal allerdings unter Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ergab sodann (Tabelle 2), daß die fu-Enzymaktivität gleichmäßig über alle Organe der Kichererbsen verteilt ist.

Die früher gemessene unterschiedliche Verteilung beruhte offensichtlich auf einem unterschiedlichen endogenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt der Protein-

präparationen, wahrscheinlich bedingt durch unterschiedlich hohe Mengen von Katalase.

#### DISKUSSION

Die Ergebnisse in Abb. 2 und Tabelle 1 beweisen, daß alle Peroxidasen die generelle Fähigkeit zum Flavonolabbau besitzen. Dabei sind neben dem Abbau über 2,3-Dihydroxyflavanone zu Benzoesäuren und weiteren, noch nicht identifizierten Produkten des A-Rings und des Heterozyklus,

Tabelle 2. Vergleich der spezifischen—sowie der Gesamtperoxidaseaktivität der verschiedenen Organe eines acht Tage alten Keimlings von *Cicer arietinum*, als Substrat wurde Kämpferol verwendet

Pflanzenorgan	Enzymaktivität mit Kämpferol	
	Spez. Akt. ( $\mu\text{mol/mg. Prot.}$ )	Gesamtaktivität ( $\mu\text{mol/l g Frischgewicht}$ )
Knospen	9,3	124
Jüngere Blätter	10,2	127
Ältere Blätter	7,8	81
Blattstiele	10,9	32
Stengel	10,0	67
Hypokotyl	55,0	208
Kotyledonen	15,9	327
Wurzeln	17,9	60

offensichtlich auch noch weitere Reaktionsmöglichkeiten sowohl bei Flavonolaglyka als auch bei Flavonolglykosiden möglich. Der Peroxidase-katalysierte Flavonolabbau kann sogar bis zu  $\text{CO}_2$  führen, wobei jedoch nicht alle Schritte enzymatischer Natur zu sein brauchen. Insgesamt stellt sich der Abbau von Flavonol durch Peroxidasen als ein sehr komplexes Bild verschiedener Reaktionsmöglichkeiten dar. Die große Breite der Reaktionsmöglichkeiten von Peroxidasen ist ja von einer großen Zahl phenolischer Substrate bekannt, wobei neben anabolen Stoffwechselwegen und Polymerisationsreaktionen (Ligninbildung) auch Abbaureaktionen vorkommen. So bestehen z. B. verschiedene Reaktionsmöglichkeiten bei Chalkonen [5, 17], Benzoessäuren [13], Auronen [18], Flavanonen [19] und selbstverständlich bei synthetischen Substraten [10], wodurch sich unter anderem auch die Schwierigkeiten bei der Strukturaufklärung der zahlreichen Reaktionsprodukte erklären. Der Abbau von Auronen durch Peroxidase [18, 20] erfolgt im Prinzip nach dem gleichen Schema wie der der Flavonole, da sich vergleichbare Abbauprodukte bilden.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Beweise für einen Polyphenolabbau durch Peroxidasen sind im Zusammenhang mit der mehrfach beschriebenen Schutzfunktion von Polyphenolen auf die IAA-Oxidase von Bedeutung. In solchen Fällen ist wohl ein vorrangiger Abbau der Polyphenole an Stelle der Indolylessigsäure durch Peroxidase anzunehmen [21].

In unseren früheren Untersuchungen haben wir für den Abbau von Flavonolen durch fu-Enzym, d. h. durch Peroxidasen, eindeutig einen Verbrauch von molekularem Sauerstoff nachgewiesen [2]. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sano [22], der den Einfluß von Quercetin auf die kinetischen Daten des oxidativen IAA-Abbaus durch Peroxidase aus *Pisum sativum* untersuchte und dabei nur für die IAA-Oxidation nicht aber für den Quercetinabbau Verbrauch von molekularem Sauerstoff feststellen konnte. Auch der Hinweis, daß Quercetin zu einer blau-violetten Verbindung abgebaut wird, steht im völligen Gegensatz zu unseren Untersuchungen. Da der Autor die IAA-Oxidaseaktivität durch Messung des Sauerstoffverbrauchs bestimmte, berechtigt die u. E. falsche Annahme, daß der Quercetinabbau keinen Beitrag zum Sauerstoffverbrauch leistet, zu

erheblichen Bedenken gegen die Aussagekraft der angeführten Ergebnisse.

Ob der in *Cicer arietinum* gemessene Umsatz von Flavonolen [23] oder der in Tabakpflanzen beobachtete Flavonolabbau [24] mit der Wirkung von Peroxidasen zusammenhängt, ist bisher noch unklar. Der bei pflanzlichen Zellkulturen gemessene starke Abbau der Flavonolaglyka [3] ist dagegen mit ziemlicher Sicherheit zum großen Teil auf die Aktivität von Peroxidasen zurückzuführen. Es kann gegenwärtig noch nicht gesagt werden, welche physiologische Bedeutung dem Abbau von Flavonolen durch Peroxidasen zukommt.

Scopoletin und Ferulasäure werden als physiologische Substrate der Peroxidase von *Nicotiana tabacum*, vielleicht im Zusammenhang mit deren IAA-Oxidasefunktion, angesehen, da in dieser Pflanze spezifische Isoenzyme für die beiden Substrate vorliegen [7, 8]. Da wir spezifische Peroxidase-Isoenzyme der Flavonolumsetzung dagegen bei unseren Untersuchungen nicht nachweisen konnten, muß die physiologische Bedeutung dieser Reaktion in weiteren Untersuchungen kritisch überprüft werden. Dies gilt ebenfalls für die bisher noch nicht strukturell aufgeklärten Flavonolkatalbolite aus den Peroxidasereaktionen.

#### EXPERIMENTELLES

*Chemikalien und Geräte.* Meerrettich-Peroxidase (E.C. 1.11.1.7), Katalase und die Vergleichsproteine für die isoelektrische Fokussierung wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen. Die benutzten Phenole stammten von der Fa. Roth, Karlsruhe. Die Herstellung von ( $^{14}\text{C}$ )-Kämpferol wurde bereits beschrieben [3]. Die Messung der optischen Aktivität wurde mit einem Polarimeter P141 der Firma Perkin-Elmer durchgeführt, die Enzymumsetzungen wurden in einem Unicam SP 800- oder einem Zeiss PMQ II-Spektralphotometer gemessen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Trennkammer der Fa. LKB, Stockholm, mit einem Steuergerät der Fa. Ortec, Oak Ridge, U.S.A.

*Pflanzenmaterial.* Die Keimlinge von *Sinapis alba* wurden unter dunkelrotem Licht angezogen [14] und nach 96 Stunden aufgearbeitet. Anzucht und Haltung der verwendeten Zellkulturen von *Cicer arietinum* entsprachen früheren Angaben [3].

*Herstellung der Enzympräparation.* 1 g Frischpflanzenmaterial oder 0,3 g Acetontrockenpulver wurden mit 1 g Quarzsand und 4 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,5) 10 min im Mörser homogenisiert und das Homogenat 30 min bei 50000 g zentrifugiert. Der Ueberstand wurde bis zu einer Konzentration von 0,1 M mit dem Katalasehemmstoff 3-Amino-1,2,4-triazol (AT) versetzt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert, wodurch Katalase fast vollständig gehemmt wird [25, 26]. Anschließend erfolgte eine Ammonsulfatfällung bis zu 80% Sättigung, der Niederschlag wurde in Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,0, 0,1 M an AT) aufgenommen und mit Hilfe der Zentrifugentechnik durch Sephadex G 25 fine filtriert. Alle Arbeitsgänge

wurden bei 4 durchgeführt. Das Sephadex G 25 fine-Filtrat wurde in die Inkubationsansätze sowie für die isoelektrische Fokussierung eingesetzt.

**Enzymatische Flavonolumsetzung.** 0,2  $\mu$ mol Flavonol, in 0,1 ml Äthylenglykolmonomethyläther gelöst, wurden mit 1,7 ml Tris HCl (0,1 M, pH 7,5) oder Citrat-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,5) und mit 0,1 ml Peroxidaselösung versetzt. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 0,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (4 mmolar) gestartet, bei Zimmertemperatur direkt in Küvettenhalter inkubiert und die Aenderung der UV-Absorption in bestimmten Zeitabständen registriert. Bei quantitativen Messungen wurde die Abnahme der Flavonolextinktion bei 366 nm direkt mit einem Schreiber registriert und die Anfangsgeschwindigkeit bestimmt, wobei quantitative Bestimmungen ausschließlich im Citrat-Phosphatpuffer (pH 5,5) durchgeführt wurden.

**Messung der Peroxidaseaktivität mit o-Dianisidin.** Der Inkubationsansatz bestand aus 0,05 ml einer 0,5%igen o-Dianisidinlösung (180  $\mu$ mol), 2,75 ml Acetatpuffer (0,05 M, pH 5,4) sowie 0,1 ml Peroxidaselösung und gestartet wurde mit 0,1 ml einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (0,1 M). Die Zunahme der Extinktion bei 546 nm wurde direkt mit einem Schreiber registriert und die Anfangsgeschwindigkeit in AE/min ermittelt.

**Reinigung des 2,3,5,7,4'-Pentahydroxyflavanon.** Die Reinigung dieses Kämpferol-Abbauproduktes zur Messung der optischen Aktivität wurde wie beschrieben [2] durchgeführt und in Methanol (ca 20 mg/10 ml) zur Messung gebracht.

**Abbau von (U-<sup>14</sup>C)-Kämpferol durch Peroxidase.** 0,15  $\mu$ mol (U-<sup>14</sup>C)-Kämpferol (Gesamtradioaktivität 90000 dpm) wurden mit 1  $\mu$ g Peroxidase und 0,4  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsprechend dem oben geschriebenen Ansatz in einem luftdicht abgeschlossenen Gefäß 60 min inkubiert, wobei das sich entwickelnde <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> durch ein in dem Gefäß befindliches Auffanggefäß in einer Lösung aus Äthanolamin/Äthylenglykolmonomethyläther (1:2) absorbiert wurde. Am Ende der Inkubation wurde die Radioaktivität in der Absorptionslösung gemessen und der Inkubationsansatz mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt sowie der wässrige Rückstand wurden durch Dünnschichtchromatographie in den früher beschriebenen Laufmittelsystemen [2] und die Radioaktivitätsverteilung durch Scanning bestimmt.

**Isoelektrische Fokussierung.** Die Trennung der Peroxidase-Isoenzyme durch isoelektrische Fokussierung wurde auf Sephadex G 75 superfine beschichteten Dünnschichtplatten (20  $\times$  40 cm) entsprechend der Methode von Delincée und Radola [15] durchgeführt. Die Konzentration am Ampholinen (pH 3-10) im Gel war 2%, die Dauer der Fokussierung unter Kühlung der Platte auf 4 betrug 18 Stunden bei 800 Volt (15 mA). Zur Kontrolle der Fokussierungen wurden jeweils die gefärbten Proteine Cytochrom C, Myoglobin und Ferritin mit aufgetragen. Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Peroxidase-Isoenzyme entweder durch Färbung eines mit o-Dianisidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> getränkten Papierstreifen detektiert oder nach Elution mit Puffer und Entfernung der Ampholine durch Filtration an einer kleinen Sephadex G 25 fine-Säule nach den oben beschriebenen Methoden auf ihre Aktivität untersucht. Die Inaktivierung der Peroxidasen bei der isoelektrischen Fokussierung war beträchtlich, da nur jeweils ca 30% der eingesetzten Gesamtaktivität nach der Trennung eluiert werden konnten.

Nach Abschluß unserer experimentellen Arbeiten erhielten wir in einer persönlichen Mitteilung Kenntnis, daß von W.

Schreiber vergleichbare Ergebnisse mit Flavonolen und Peroxidasen erhalten worden waren (vergl. (1974) *FEBS-Letters* **41**, 50).

**Anerkennungen**—Herrn Doz. Dr. P. Schöpfer und Frau C. Plachy, Freiburg, danken wir für die Möglichkeit, die isoelektrischen Fokussierungen unter ihrer Anleitung in ihrem Labor durchzuführen. Herrn Dr. Ullrich, Freiburg, danken wir für die Messung der optischen Aktivität. Herrn Dr. Wellmann, Freiburg, für die wertvollen Hinweise hinsichtlich der Peroxidasen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Unterstützungen.

## LITERATUR

1. Barz, W. und Hösel, W. (1974) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H., Eds.), Chapman and Hall, Ltd. im Druck.
2. Hösel, W. und Barz, W. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **261**, 294.
3. Hösel, W., Shaw, P. D. und Barz, W. (1972) *Z. Naturforsch.* **27b**, 946.
4. Hösel, W., Frey, G., Teufel, E. und Barz, W. (1972) *Planta (Berl.)* **103**, 74.
5. Rathmell, W. G. und Bendall, D. S. (1972) *Biochem. J.* **127**, 125.
6. Kindl, H. (1971) *Phytochemistry* **10**, 1475.
7. Reigh, D. L., Wender, S. H. und Smith, E. C. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1265.
8. Pickering, J. W., Powell, B. L., Wender, S. H. und Smith, E. C. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2639.
9. Siegel, B. Z. und Galston, A. W. (1967) *Science (Wash.)* **157**, 1557.
10. Steelink, C. (1972) in *Recent Advances in Phytochemistry* (Runeckles, V. C. und Watkins, J. E., Eds.) Vol. 4, p. 239ff. Appleton-Century-Crofts, New York.
11. Hösel, W. (1972) Dissertation Universität Freiburg/Brsg.
12. Scott, A. I. (1965) *Quart. Rev.* **19**, 1.
13. Berlin, J. und Barz, W. (1974) *Planta Medica*, im Druck.
14. Schöpfer, P. und Plachy, C. (1973) *Z. Naturforsch.* **28c**, 296.
15. Delincée, H. und Radola, B. J. (1972) *Anal. Biochem.* **48**, 536.
16. Shannon, L. M. (1968) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **19**, 183.
17. Wong, E. und Wilson, T. M. (1972) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 132.
18. Teufel, E. (1974) Diplomarbeit Universität Freiburg/Brsg.
19. Berlin, J., Patzlaff, M., Mohr, F., Teufel, E. und Barz, W. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 1170.
20. Barz, W., Mohr, F. und Teufel, E. (1974) *Phytochemistry*, im Druck.
21. McClure, J. (1974) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. und Mabry, H., Eds.), Chapman and Hall Ltd. im Druck.
22. Sano, H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **227**, 565.
23. Barz, W. und Hösel, W. (1971) *Phytochemistry* **10**, 335.
24. Dietermann, L. J., Wender, S. H., Chorney, W. und Skok, J. (1969) *Phytochemistry* **8**, 2321.
25. Mohr, H. (1970) *Cytobiologie* **2**, 335.
26. Frederick, S. E. und Newcombe, E. H. (1969) *J. Cell. Biol.* **43**, 343.