Gartenbauwissenschaft, **65** (2). S. 65–73, 2000, ISSN 0016–478X. © Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Ausgewählte pflanzliche Inhaltsstoffe und ihr antioxidatives Potential in hydrophilen und lipophilen Extrakten von Phaseolus vulgaris-, Malus domestica- und Vitis vinifera-Blättern

Selected Plant Components and their Antioxidative Capacity in Hydrophilic and Lipophilic Extracts of Phaseolus vulgaris, Malus domestica, and Vitis vinifera Leaves

Michaela Schmitz und G. Noga
(Institut für Obst- und Gemüsebau der Universität Bonn)

Zusammenfassung

In *in vitro* Versuchen wurden Art und Anteil einzelner Pflanzeninhaltsstoffe mit Radikalfängerpotential (Tocopherole, Tocotrienole, Phenole, Ascorbinsäure und Carotinoide) in Blattextrakten von *Phaseolus vulgaris*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* untersucht. Unter Verwendung von Standardsubstanzen wurden zunächst die antioxidativen Potentiale (AP) in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt und miteinander verglichen. Der Beitrag der einzelnen Inhaltsstoffe zum antioxidativen Gesamtpotential der lipophilen und hydrophilen Pflanzenextrakte wurde berechnet. In den untersuchten Pflanzenextrakten dominierten mengenmäßig die Phenole (8500 µg/g FS bei Apfelblättern, 4300 µg/g FS bei Rebblättern, 400 µg/g FS bei Bohnenblättern), gefolgt von den Carotinoiden, den Tocopherolen, der Ascorbinsäure und den Tocotrienolen. Hinsichtlich der Radikalfängerpotentiale konnte folgende Reihe aufgestellt werden: Tocopherole > β-Carotin > Phenole > Ascorbinsäure. Der Beitrag der einzelnen Pflanzeninhaltstoffe zum antioxidativen Potential war je nach Pflanzenextrakt unterschiedlich. Im Hexanextrakt überwog bei Reb- und Apfelblättern der Beitrag des β-Carotins mit 52 % bzw. 55 % gegenüber 39 % bzw. 45 % im Falle des Tocopherols. Bei Bohne dagegen lieferte α-Tocopherol mit 43 % einen höheren Anteil als β-Carotin mit 38 %. Im Methanolextrakt partizipierten die Phenole mit 32 % bei Bohnenblättern, 94 % bei Apfelblättern und 89 % bei Rebblättern am antioxidativen Gesamtpotential.

Summary

In in vitro studies the amount of selected antioxidative components (tocopherols, tocotrienols, ascorbic acid, β-carotene and phenolic compounds) in leaf extracts of *Phaseolus vulgaris, Malus domestica* and *Vitis vinifera* plants was measured. The antioxidative capacity of each component at different levels of concentration was determined using pure reference substances. Furthermore, the antioxidative capacity of leaf extracts of *Phaseolus vulgaris, Malus domestica* and *Vitis vinifera* was evaluated. Finally, the contribution of the selected components to the antioxidative capacity in hexane and methanol extracts was calculated.

In the plant leaf extracts the content of phenolic compounds dominated (8500 µg/g fr. wt. in *Malus domestica*, 4300 µg/g fr. wt. in *Vitis vinifera*, 400 µg/g fr. wt. in *Phaseolus vulgaris*) followed by β-carotene, α-tocopherol, ascorbic acid and the tocotrienols. Measurements of the antioxidative capacity revealed that α-tocopherol had the greatest radical scavenging capacity followed by β-carotene, phenolic compounds and ascorbic acid. The majority of the antioxidative capacity in the hexane extract of *Malus domestica* and *Vitis vinifera* leaves originated from β-carotene with 55 % and 52 % respectively, whereas α-tocopherol contributed 39 % and 45 % respectively. In hexane extracts of *P. vulgaris* leaves α-tocopherol added 43 % to the total antioxidative capacity followed by β-carotene with 38 %. In the hydrophilic methanol extract the phenolic compounds amounted for 32 % in *P. vulgaris*, 94 % in apple and 89 % in grape leaves to the total antioxidative capacity.

Einleitung

Luftschadstoffe, wie Ozon und Schwefeldioxid, sowie Kälte, Trockenheit oder Hitze können unter Zusammenwirken mit Licht und Sauerstoff im pflanzlichen Organismus die Bildung freier Sauerstoffradikale verursachen (ELSTNER 1987, KRIEG 1992), welche nachfolgend mit Membranlipiden (KUNERT und DODGE 1988, MÖRSEL 1990, WINSTON 1990), Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Verbindungen (FOOTE et al. 1984, LARSON 1988) reagieren. Dies kann in einer Zerstörung dieser Zellinhaltstoffe und im weiteren Verlauf in einer Beeinträchtigung wichtiger biologischer Funktionen und letztlich im Zelltod resultieren (SCANDALIOS 1993). Auch unter schadstofffreien Bedingungen kann es im normalen, ungestörten Stoffwechsel der Pflanze in den Chloroplasten, z. B. bei der photosynthetischen Reaktion, zur Bildung freier Radikale und deren Folgeprodukten kommen (PALLETT und YOUNG 1993). Zum Schutz vor dem Angriff und der Wirkung freier Radikale verfügt die Pflanze über ein antioxidatives System. Dieses umfaßt neben bestimmten Enzymen wie Katalasen, Superoxiddismutasen und Peroxidasen (BUTT 1980, LARSON 1988) antioxidativ wirksame Stoffe, wie z. B. Tocopherole (FRYER 1992, KRIEG 1992, HESS 1993), Carotinoide (JONES und PORTER 1986, PALLETT und YOUNG 1993, SCANDALIOS 1993), verschiedene Phenole (LARSON 1988) oder Ascorbinsäure (LOEWUS 1980, 1988, FOYER 1993). Ein Überschreiten der Kapa-

zität des antioxidativen Schutzsystems resultiert in Schädigungen der Pflanze (PALLETT und YOUNG 1993). Die genannten antioxidativ wirksamen Substanzen können als Radikalfänger wirken, indem sie ein Wasserstoff-Atom abgeben und dadurch selbst zum Radikal werden. Dieses neu gebildete Radikal kann aufgrund seiner konjugierten Doppelbindungen durch Mesomerie zur Eigenstabilisierung beitragen, so daß die Kettenreaktion nicht fortgesetzt wird (BELITZ und GROSCH 1994). Treffen zwei Radikale aufeinander, kommt es zu einer Abbruchreaktion. Das Radikalfängerpotential der verschiedenen in den Pflanzen enthaltenen antioxidativen Substanzen ist sehr unterschiedlich. Das antioxidative Potential eines Stoffes wird ermittelt, indem ein oxidationsempfindlicher Stoff durch eintretenden Sauerstoff sukzessive oxidiert wird. Ist ein Antioxidans zugegen, kann diese Oxidation unterbunden werden, wobei das Ausmaß des Radikalfängerpotentials von der antioxidativen Kapazität und der Konzentration des jeweiligen Stoffes abhängig ist (CHEVOLLEAU et al. 1992). Über den Gehalt und den Beitrag verschiedener Antioxidantien zum antioxidativen Potential bei gärtnerischen Nutzpflanzen ist bisher wenig bekannt.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, Art und Anteil von Substanzen mit Radikalfängerpotential in Blattextrakten von *Phaseolus vulgaris* L., *Malus domestica* Borkh. und *Vitis vinifera* L. zu untersuchen. Dazu sollten zunächst das antioxidative Potential einzelner Inhaltsstoffe anhand von Reinsubstanzen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration bestimmt und Eichkurven erstellt werden. Anschließend sollte der prozentuale Beitrag der lipophilen und hydrophilen Pflanzeninhaltsstoffe zu dem antioxidativen Potential des jeweiligen lipophilen (Hexanextrakt) bzw. hydrophilen (Methanolextrakt) Pflanzenextraktes ermittelt werden.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Phaseolus vulgaris: Die Untersuchungen wurden an Primärblättern von 10 Tage alten Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris* L. var. nanus) durchgeführt. Die Anzucht der Buschbohnen wurde in einem klimatisierten Raum bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden vorgenommen. Die Temperatur und die rel. Luftfeuchtigkeit betrugen während der Lichtphase 23–27 °C bzw. 30–50 %, in der Dunkelphase 18–22 °C bzw. 60–80 %. Die Belichtung der Versuchspflanzen erfolgte über 400 W Hochdruck-Quecksilberdampflampen, mit denen eine Lichtintensität von 160 μmol $m^{-2}s^{-1}$ in Höhe des Pflanzenbestands erreicht wurde.

Vitis vinifera und Malus domestica: Die Analysen bei *Vitis vinifera* L. ssp. vinifera wurden an Blättern der Rebsorte 'Blauer Spätburgunder' (Unterlage 5c) durchgeführt. Die Blätter wurden von Rebstöcken aus einer nach den Richtlinien der Integrierten Produktion geführten Versuchsparzelle der Staatlichen Weinbaudomäne Marienthal/Ahr am 25. August und 8. September 1994 entnommen. Es wurden ausschließlich gesunde, unbeschädigte Blätter (das jeweils fünfte Blatt, gezählt von der Triebspitze) für die Untersuchungen herangezogen. Es wurde darauf geachtet, daß vor den Probenahmen die Blätter mindestens 1 Woche nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt wurden.

Weitere Analysen wurden an Apfelblättern (*Malus domestica* Borkh, ssp. domestica) der Sorte 'Jonagold' (Unterlage M 9) durchgeführt. Die Probenahme erstreckte sich auf das jeweils 5. Blatt von der Triebspitze von einjährigen Langtrieben. Das Blattmaterial wurde von Bäumen der Obstversuchsanlage Klein-Altendorf der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn entnommen. Die Bewirtschaftung der Parzelle erfolgte auch hier nach den Richtlinien der Integrierten Produktion.

Methoden

Carotinoidbestimmung: Die Carotinoidbestimmung erfolgte in Anlehnung an die von der „Internationalen Fruchtsaftunion" veröffentlichte Methode (ANONYMOUS 1972). Zur Bestimmung von Carotinoiden in Blattmaterial wurde die Methode geringfügig modifiziert. Zehn Gramm des zu untersuchenden Blattmaterials wurden nach Gefrieren mit Flüssigstickstoff mit einer Schwingmühle der Fa. Retsch, Langenfeld, zu einem feinen Pulver zerkleinert. Die zerkleinerten Blätter wurden in einem 250 ml Schüttelgefäß mit 100 ml Diethylether und 100 ml Petrolether (PE) durch 6-stündiges Schütteln extrahiert. Die Extraktionslösung wurde durch Zentrifugation von festen Bestandteilen befreit und danach mit ethergesättigtem Wasser gewaschen. Zur Entfernung der Chlorophylle wurden die Extraktionslösungen mit 15 ml methanolischer KOH (18 %ig) für 12 h versetzt. Nach Verdünnung der Mischungen mit 50 ml Methanol erfolgte die Extraktion der Carotinoide mit 100 ml PE. Zur Phasentrennung wurden 10 ml destilliertes Wasser zugesetzt und die Lösung für 30 min. dunkel gestellt. Die PE-Fraktion wurde abgetrennt, eingeengt und der Rückstand in 10 ml des gleichen Lösungsmittels aufgenommen.

Zur Aufreinigung wurden 4 ml des PE-Extrakts auf eine Kieselgel-Säule gegeben. Der Farbstoff wurde mit 25 ml Petrolether extrahiert und der Extrakt mit PE auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend im Verhältnis 1:2 (v/v) verdünnt und mit Hilfe eines Spektralphotometers in einer 1 cm Küvette gegen Luft bei einer Wellenlänge von λ = 450 nm gemessen. Die Identität der Carotinoide wurde durch Messung der Absorptionskurve zwischen 300 und 540 nm durch Vergleich der 3 Absorptionsmaxima (λ = 425 nm; λ = 448 nm und λ = 475 nm) mit β-Carotin als Standardsubstanz überprüft (DAVIES et al. 1970a). Die Ermittlung des quantitativen Carotinoid-Gehaltes erfolgte anhand einer Eichkurve.

Gesamtphenolgehalt: Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes erfolgte in Anlehnung an die Methode von MC MURROUGH und HENNINGAN (1984). Der Gesamtphenolgehalt umfaßte alle in den entsprechenden Pflanzenextrakten enthaltenen Phenole mit Ausnahme der Tocopherole bzw. Tocotrienole.

Zehn Gramm des Blattmaterials wurden nach Gefrieren mit Flüssigstickstoff mit einer Schwingmühle der Fa. Retsch, Langenfeld, zu einem feinen Pulver zerkleinert. Die Abtrennung der Tocopherole erfolgte nach 3-stündigem Ausschütteln mit Hexan, die Extraktion der hydrophilen Phenole nach zweimaligem Ausschütteln mit 300 ml Methanol für 4 h.

Es wurden 0,5 ml einer methanolischen Probelösung mit 0,5 ml Wasser versetzt. Nach Zugabe von 0,5 ml

Folin-Ciocalteau-Reagenz wurden exakt 30 s später 5 ml einer Natriumhydroxid-Lösung zugegeben, geschüttelt und nach 30 min. die Extinktionen der Probenlösungen bei λ = 720 nm gegen einen Probenleerwert gemessen.

Der Gesamtphenolgehalt wurde in Form von Gallussäureeinheiten ermittelt. Zur Herstellung der Eichlösungen wurden 28 mg Gallussäuremonohydrat in 100 ml Methanol p.a. gelöst (= 250 mg Gallussäure/l). Von dieser Stammlösung wurden Verdünnungsstufen der Konzentrationen 125 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l sowie 12,5 mg/l hergestellt. Die Messung der Eichlösungen erfolgte bei λ = 720 nm. Der Gesamtphenolgehalt der Blattproben wurde anhand der erstellten Eichkurve bestimmt.

Diphenole: Für die Bestimmung des Diphenolgehaltes wurden 10 g des Pflanzenmaterials mit Hilfe von Flüssigstickstoff schockgefroren und zu einem feinen Pulver zerkleinert. Die weitere Aufarbeitung der Proben und die Quantifizierung des Diphenolgehaltes erfolgte nach der von ARNOW (1937) publizierten Methode. Nach Entfernen der lipophilen Stoffe durch Extraktion mit Hexan wurden die Diphenole nach Versetzen mit Methanol durch 12-stündiges Schütteln extrahiert.

Der Gehalt an Diphenolen wurde anhand einer Eichkurve in Chlorogensäure-Äquivalenten wiedergegeben.

L-Ascorbinsäure-Bestimmung: Die Bestimmung der L-Ascorbinsäure erfolgte enzymatisch mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren Testsatzes der Fa. Boehringer in Mannheim (ANONYMUS 1995). Dazu wurden jeweils 3 g des zerkleinerten Probenmaterials mit 3 ml Metaphosphorsäurepuffer extrahiert und der Extrakt durch Zentrifugation von festen Bestandteilen befreit. Zur Ermittlung des L-Ascorbinsäuregehaltes wurde jeweils 1 ml des Extraktes verwendet.

Tocopherol-Bestimmung: Die tiefgefrorenen Blattscheiben wurden in mit Flüssigstickstoff gekühlte Teflonzellen eingebracht. Bei einer Drehzahl von 5000 U/min. wurden die tiefgefrorenen Blattscheiben mit Hilfe eines Dismembrators (Fa. Retsch, Langenfeld) unter Verwendung einer Stahlkugel (Durchmesser 11 mm) zerkleinert. Nach 2 min. wurden die Teflonzellen mit Aufschlußpuffer (10 mmol Tris(Hydroxymethyl)aminomethan, 1 mmol EDTA, 1 mmol 1,4-Dithioerythrit, 150 mmol Natriumchlorid) versetzt und erneut 2 min. geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml Aufschlußpuffer sowie 3 ml Extraktionslösung (Hexan/Isopropanol 2:1 unter Zusatz von 0,125 g/l 2,6-Ditert-butyl-p-kresol (BHT)) wurden die Proben 10 min. bei 5000 U/min. zentrifugiert. Zur zweiten Extraktion wurden 2,1 ml Hexan und 0,125 g BHT zugesetzt. Nach erneuter Zentrifugation und Überführung des Überstandes wurde der Extrakt auf 1 ml eingeengt.

Folgende Geräte wurden zur Tocopherolanalyse verwendet:

Hochdruckflüssigkeitschromatograph: Modell 6000 A; Waters Associates Chromatography, Langenfeld; Injektionssystem: Probenschleife und Bypass mit 100 μl Schleife (CS-Chromatographie, Langerwehe); Detektor: Fluoreszenz-Detekor RF-551 (Shimadzu, Duisburg); Anregungswellenlänge: 285 nm; Emissionswellenlänge: 320 nm; Rechner-Integrator: Modell 3393 A (Hewlett-Packard, Böblingen); Säule: LiChrosorb Si 60: 25 cm, Innendurchmesser: 4 mm, Partikelgröße des Säulenfüllmaterials: 5 μm; Vorsäule: LiChrosorb Si 60, 4 cm; Innendurchmesser: 4 mm; Partikelgröße des Säulenfüllmaterials: 5 μm.

Vier Minuten nach Analysenbeginn erfolgte eine Säulenumschaltung, so daß die Vorsäule unabhängig von der Hauptsäule mit dem Eluenten durchspült wurde (backflash). Durch dieses Verfahren konnte die Vorsäule von unerwünschten Rückständen befreit werden.

Als Eluent wurde ein Gemisch aus 3,1 % Ethylacetat und 96,9 % Hexan verwendet. Vor Beginn jeder Analyse wurde das Elutionsmittel durch Vakuum-Filtration entgast. Die Durchführung der Analysen erfolgte bei Raumtemperatur (22 °C). Als externer Standard wurden α, β, γ und δ-Tocopherol (Merck, Darmstadt) verwendet.

Zur Tocopherol Bestimmung wurden jeweils 10 μl der Reb- bzw. Apfelblatt- sowie 100 μl der Bohnenblattextrakte in das HPLC-Gerät injiziert. Anhand der Eichkurve wurden unter Berücksichtigung der einzelnen Verdünnungsstufen die Tocopherolgehalte in den verschiedenen Blattextrakten ermittelt.

Antioxidatives Potential (AP): Das antioxidative Potential, das nach CHEVOLLEAU et al. (1992) bestimmt wurde, ist eine fiktive Größe, die in Milliextinktionen (mE) angegeben wird.

Die frischen Blätter wurden unmittelbar nach der Probenahme in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Mörser zerkleinert. Anschließend wurden 10 g des pulverisierten Blattmaterials mit 100 ml Hexan unter Lichtausschluß für 60 min. extrahiert. Nach Dekantieren des Hexanextraktes wurden zu dem verbliebenen Rückstand 200 ml Methanol zur Extraktion der wasserlöslichen Substanzen zugesetzt und nach 60 min. auch der hydrophile Extrakt dekantiert. Beide Phasen wurden eingeengt. Zur Messung des antioxidativen Potentials des lipophilen bzw. des hydrophilen Extraktes wurde der Hexanrückstand in 10 ml Hexan und der Methanolrückstand in 10 ml Methanol aufgenommen.

Öl-Wasser Emulsion: Es wurden zunächst 1 mg β-Carotin in 10 ml Chloroform gelöst. Zu 0,2 ml dieser Lösung wurden 5 ml Chloroform zugesetzt. Zu Kontrollzwecken wurde die Absorption der Lösungen gemessen, die bei λ = 470 nm 0,75 + 0,05 betragen soll.

Anschließend wurden 5 ml dieser Carotinoid-Chloroformlösung mit 20 mg Linolsäure und 200 mg Tween 40 versetzt. Nach Verdampfen des Chloroforms wurden die Substanzen mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Absorption der Öl/Wasser-Emulsion wurde bei 470 nm gemessen.

Zur Bestimmung der antioxidativen Potentiale wurden jeweils 5 ml der Emulsion mit jeweils 200 μl der Reinsubstanzen verschiedener Konzentrationen (α-Tocopherol, β-Carotin, L-Ascorbinsäure, Gallussäure, Chlorogensäure) sowie der beiden Pflanzenextrakte (Hexan- und Methanol-Extrakt) versetzt. Als Vergleichswerte dienten Lösungen der Emulsion ohne Reinsubstanz- bzw. Pflanzenextraktzusatz. Zusätzlich wurden Reinsubstanzen gleicher Konzentrationen (400 μg/ml) der Tocopherole (α, β, γ, δ-Tocopherole) für die Untersuchungen eingesetzt und die antioxidativen Potentiale der Tocopherole verglichen. Die Lösungen wurden bei 50 °C im Wasserbad inkubiert und die Absorptionen alle 30 min. bei λ = 470 nm über einen

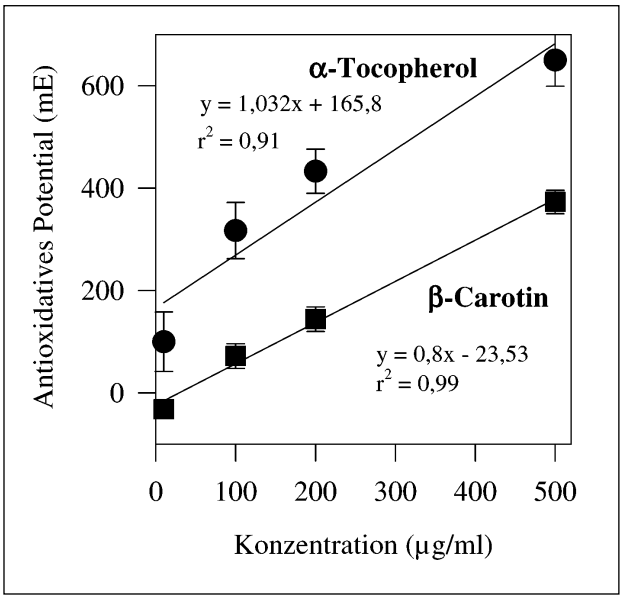


Abb. 1. Antioxidative Potentiale von α-Tocopherol- und β-Carotin-Reinsubstanzen in Abhängigkeit ihrer Konzentration bei Verwendung von Hexan als Lösungsmittel im β-Carotin/Linolsäure-*in vitro*-Test. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6.
Antioxidative capacity of α-tocopherol and β-carotene reference substances as influenced by their concentration in a β-carotene/linoloic acid-in vitro test system; as a solvent hexane was used. Mean ± SE, n = 6.

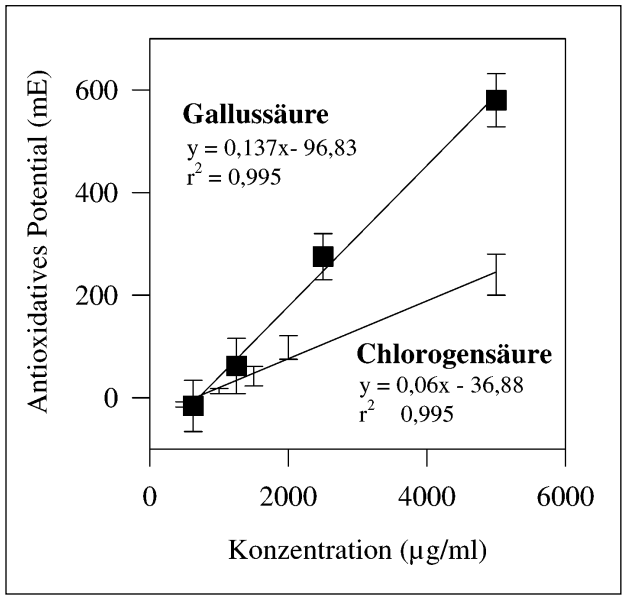


Abb. 2. Antioxidatives Potential von Gallus- und Chlorogensäure-Reinsubstanzen in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration bei Verwendung von MeOH als Lösungsmittel im β-Carotin/Linolsäure-*in vitro*-Test. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6.
Antioxidative capacity of galloic and chlorogenic acidseference substances as influenced by their concentration in a β-carotene/linoloic acid-in vitro test system; as a solvent methanol was used. Mean ± SE, n = 6.

Zeitraum von 2 Stunden gemessen. Anhand der Absorptionswerte konnten die antioxidativen Potentiale der beiden Extrakte nach folgender Formel errechnet werden (CHEVOLLEAU et al. 1992):

$$AP = \frac{AEmPE(120) - AE(120)}{AE(0) - AE(120)} \times 1000$$

AP = antioxidatives Potential
AEmPE(120) = Absorption der Emulsion mit Pflanzenextrakt nach 120 min.
AE(0) = Absorption der Emulsion ohne Antioxidans sofort nach der Herstellung
AE(120) = Absorption der Emulsion ohne Antioxidans nach 120 min.

Statistische Auswertungen

Bei Vorliegen von Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden die Versuchsdaten einer Varianzanalyse unterzogen (KÖHLER et al. 1994). Es gingen jeweils 6 Wiederholungen der einzelnen Versuchsvarianten als statistische Grundeinheit in die Berechnungen ein. Die Signifikanzen zwischen den behandelten und nichtbehandelten Varianten einer Sorte wurden mit Hilfe multipler Mittelwertvergleiche (KÖHLER et al. 1994) ermittelt. In dieser Arbeit wurde der Grenzdifferenztest nach 'Tukey' angewandt. Signifikante Veränderungen sind im Begleittext beschrieben. Alle Tests wurden mit der Statistiksoftware 'Statgraphics', Rockville, Maryland, USA durchgeführt.

Ergebnisse

Antioxidative Potentiale pflanzlicher Inhaltsstoffe am Beispiel von Reinsubstanzen

Der Vergleich der AP's von α-Tocopherol und β-Carotin unter Verwendung von Reinsubstanzen ergab bei Einsatz jeweils gleicher Konzentrationen für die erstgenannte Verbindung ein um etwa den Faktor 1,4-1,7 höheres AP (Abb. 1). Im Falle von α-Tocopherol war bereits mit einem Zusatz von 10 µg/ml eine deutliche Minderung der Linolsäureoxidation möglich, während für β-Carotin erst ab der Konzentration von 100 µg/ml eine Hemmung des Oxidationsprozesses zu verzeichnen war. Eine weitere Erhöhung der Antioxidans-Konzentrationen resultierte bei beiden Substanzen in einer Steigerung des AP's. Über den gesamten geprüften Konzentrationsbereich war sowohl für α-Tocopherol als auch für β-Carotin ein linearer Zusammenhang zwischen den eingesetzten Konzentrationen und dem AP festzustellen (Abb. 1).

Auch für Gallus- und Chlorogensäure war eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen antioxidativem Potential und den eingesetzten Konzentrationen festzustellen (Abb. 2). Waren im Konzentrationsbereich bis 2000 µg/ml nur geringe Unterschiede in der antioxidativen Aktivität der beiden Substanzen zu verzeichnen, so konnte bei Zusatz höherer Konzentrationen (2000–5000 µg/ml) für die Gallussäure eine signifikant bessere Radikalfängerwirkung nachgewiesen werden. Die antioxidative Aktivität der beiden phenolischen Substanzen blieb jedoch, bezogen auf die Einwaage, deutlich hinter der von α-Tocopherol und β-Carotin zurück.

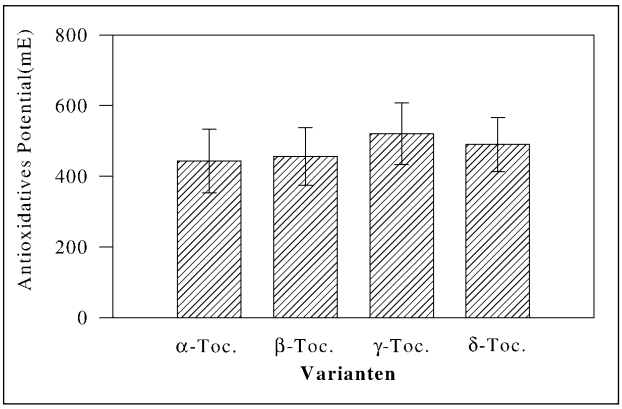


Abb. 3. Vergleich der antioxidativen Potentiale von α-, β-, γ und δ-Tocopherol Reinsubstanzen bei gleicher Konzentration (400 μg/ml) im β-Carotin/Linolsäure in vitro-Test. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6.
Antioxidative capacity of α-, β-, γ- und δ-tocopherol reference substances at an equivalent concentration (400 μg/ml) using a β-carotene/linoloic acid-in vitro test system. Mean ± SE, n = 6.

Bei Ascorbinsäure lagen die für den Konzentrationsbereich von 1000–5000 μg/ml ermittelten Werte für die antioxidative Aktivität im Bereich von –120 bis –170 Einheiten (unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Dosis-Wirkungsbeziehung war für den angegebenen Konzentrationsbereich nicht nachzuweisen.

Vergleich der antioxidativen Potentiale der Tocopherole

Nach Feststellung, daß das AP der Tocopherole das der übrigen untersuchten Substanzen deutlich überstieg, wurden in weiteren Tests die AP's der verschiedenen Tocopherole bei Einsatz gleicher Konzentration verglichen. Die antioxidativen Aktivitäten von α-, β-, γ und δ-Tocopherol-Reinsubstanzen unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 3).

Bestimmung der antioxidativen Potentiale in Gewebeextrakten von Phaseolus vulgaris, Malus domestica und Vitis vinifera

Das AP der lipophilen und der hydrophilen Extrakte von *Phaseolus vulgaris, Malus domestica* und *Vitis vinifera* sind in Tab. 1 dargestellt. Für Apfel und Rebe konnte bei Verwendung von 10 g Blattfrischgewicht im Hexanextrakt ein AP von 593 bzw. 482 Einheiten, im MeOH-Extrakt von 434 bzw. 482 Einheiten gemessen werden. Das AP des Hexan- und des Methanolextraktes der Primärblätter von im Gewächshaus angezogenen Buschbohnenpflanzen war demgegenüber mit 125 bzw. 78 Einheiten deutlich niedriger.

Gehalt und Beitrag einzelner Inhaltsstoffe zum antioxidativen Gesamtpotential bei verschiedenen Pflanzenarten

Die quantitativen Untersuchungen schlossen die Tocopherol-, die Tocotrienol-, die β-Carotin-, die Phenol- und Ascorbinsäure-Bestimmungen in den einzelnen Pflanzenextrakten ein. Tocotrienole waren in keinem der untersuchten Pflanzenextrakte nachzuweisen, die Ascorbinsäure nur in geringen Mengen in Rebblattextrakten (1,3 μg/g FS). Buschbohnen-, Apfel- und Rebblätter unterschieden sich im Gehalt der einzelnen antioxidativen Substanzen sehr deutlich (Tab. 2). Vergleichsweise geringe Konzentrationen waren mit Ausnahme der Diphenole in den Extrakten von Buschbohnen-Primärblättern nachzuweisen, die von Gewächshauspflanzen stammten. Die höchsten Werte konnten mit Ausnahme von Tocopherol, das in Rebblättern in besonders hoher Konzentration enthalten war, bei Apfelblättern ermittelt werden. Ein Vergleich der quantitativen Gehalte der lipophilen und hydrophilen Substanzen des antioxidativen Systems belegt das Vorherrschen der hydrophilen Verbindungen.

Mit Hilfe dieser Daten, der Eichkurven (Abb. 1 und 2) und der Meßergebnisse zu den Konzentrationen der Radikalfängerstoffe in den unterschiedlichen Pflanzenextrakten (Tab. 1) ließ sich der prozentuale Beitrag der einzelnen Inhaltsstoffe zum antioxidativen Gesamtpotential berechnen (Tab. 3).

Bei den lipophilen Komponenten waren bei α-Tocopherol vergleichsweise geringe Unterschiede hinsichtlich des prozentualen Anteils am Gesamtpotential in Abhängigkeit der Pflanzenart zu verzeichnen. Im Hexanextrakt trug das β-Carotin bei Bohnenblättern mit 38% und in Apfel- und Rebblättern mit 55 bzw. 52% zum antioxidativen Gesamtpotential bei.

Im methanolischen Extrakt von *Phaseolus vulgaris, Malus domestica und Vitis vinifera* leisteten die Phenole den höchsten Beitrag zum AP. Eine Beteiligung von Ascorbinsäure war unter Berücksichtigung der einge-

Tab. 1. Vergleich des antioxidativen Potentials von Blattextrakten von *Vitis vinifera*, *Malus domestica* und *Phaseolus vulgaris*. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6
Antioxidative capacity of plant extracts of Vitis vinifera-, Malus domestica- and Phaseolus vulgaris leaves using a β-carotene/linoloic acid-in vitro test system. Mean ± SE, n = 6

	Antioxidatives Potential (mE)		
Extrakt	AP (Bohne)	AP (Rebe)	AP (Apfel)
Hexanextrakt	125 ± 18	482 ± 88	593 ± 96
Methanolextrakt	78 ± 30	482 ± 50	434 ± 20

Tab. 2. Quantitativer Gehalt ausgewählter Radikalfängersubstanzen in Blattextrakten von *Vitis vinifera*, *Malus domestica* und *Phaseolus vulgaris.* Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6.
Content of radical scavenging substances in leaf extracts of Vitis vinifera, Malus domestica and Phaseolus vulgaris. Mean ± SE, n = 6.

	Gehalt (μg/g FS)		
Antioxidans	Bohne	Rebe	Apfel
Tocopherol	10 ± 5	60 ± 10	30 ± 3
Tocotrienole	n.n.	n.n.	n.n.
Carotinoide	70 ± 10	120 ± 20	140 ± 30
Ascorbinsäure	n.n.	1,3	n.n.
Gesamtphenol	400 ± 50	4300 ± 60	8500 ± 540
Diphenole	340 ± 30	240 ± 40	790 ± 30

n.n. = nicht nachweisbar

setzten Nachweismethode nur bei Rebenblättern in der Größenordnung von 1% nachzuweisen. Ein Beitrag der Ascorbinsäure zum antioxidativen Gesamtpotential bei Apfel und Bohne konnte nicht ermittelt werden, da der Gehalt unter der Nachweisgrenze lag (1,8 μg/ml bei einer Extinktionsdifferenz von 100 mE bei Verwendung des Enzymtestsatzes zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure der Fa. Boehringer, Mannheim). Die Gesamtphenole waren bei Bohnenblattextrakten zu 32%, bei Apfel- und Rebblattextrakten zu 94% bzw. 89% am antioxidativen Gesamtpotential beteiligt. Der Beitrag der Diphenole machte insgesamt bei Rebe und Apfel nur einen geringen Anteil im Vergleich zu den Gesamtphenolen aus.

Tab. 3. Prozentualer Beitrag von α-Tocopherol und β-Carotin zum antioxidativen Gesamtpotential im lipophilen (Hexan-Extrakt) und von Ascorbinsäure und Phenolen im hydrophilen Blattextrakt (Methanol-Extrakt) von *Phaseolus vulgaris, Malus domestica* und *Vitis vinifera.*
Contribution (in %) of α-tocopherol and β-carotene to the total antioxidative capacity in the lipophilic extract (hexane extract) and of ascorbic acid and phenolic compounds in the hydrophilic extract (methanol extract) of Phaseolus vulgaris, Malus domestica and Vitis vinifera leaves.

	Anteil am antioxidativen Gesamtpotential (%)		
Stoff/Stoffgruppe	Bohne	Apfel	Rebe
Hexan-Extrakt			
α-Tocopherol	43%	45%	39%
Carotinoide	38%	55%	52%
Methanol-Extrakt			
Ascorbinsäure	n.n.*	n.n.	1%
Gesamtphenol	32%	94%	89%
davon Diphenole	3,4%	10,5%	11%

n.n.* = nicht nachweisbar

Diskussion

Die Untersuchung der quantitativen Gehalte von Antioxidantien ergab, daß in den geprüften Pflanzenarten die Phenole dominierten, gefolgt von den Carotinoiden, den Tocopherolen und der Ascorbinsäure.

Hinsichtlich des antioxidativen Potentials (AP) war den Tocopherolen das größte Potential zuzuschreiben, gefolgt von den Carotinoiden, den Phenolen und der Ascorbinsäure. Auch MALLET et al. (1994), die eine enge Korrelation zwischen dem antioxidativen Potential und der α-Tocopherol-Konzentration an Extrakten von 15 verschiedenen Zierpflanzenarten nachgewiesen hatten, sprachen dem Tocopherol ein hohes AP zu. In der Literatur sind zur Bestimmung des AP verschiedene Verfahren beschrieben (CROWE et al. 1948, CHEVOLLEAU et al. 1992, TSUDA et al. 1994), die unter anderem für die Beurteilung der Eignung von Zierpflanzenextrakten zur Abwehr radikalinduzierter Krankheiten (MALLET et al. 1994) und zur Beurteilung der antioxidativen Aktivität von Pflanzeninhaltsstoffen bzw. Pflanzenextrakten Anwendung fanden (SCHMITZ und NOGA 1998). Von letzteren Autoren wurde bei *Phaseolus vulgaris* eine enge Beziehung zwischen dem antioxidativen Potential und der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber oxidativem Streß (Paraquat-Streß) nachgewiesen.

Einige der Autoren bestimmten das AP im lipophilen, andere in einem hydrophilen Extrakt. Wegen der unterschiedlichen Polarität der Antioxidantien, erhält man unterschiedliche Resultate in Abhängigkeit von dem verwendeten Medium. Bei einem Vergleich der verschiedenen Methoden erwies sich für die vorliegenden Untersuchungen die von CHEVOLLEAU et al. (1992) beschriebene als die praktikabelste (HILLEBRANDT und SCHMITZ unveröffentlichte Ergebnisse), da sie in *in vitro* Studien die beste Korrelation zwischen eingesetzter Antioxidanskonzentration und dem erfaßten AP lieferte.

Tocopherole

Hinsichtlich des AP's konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Tocopherolen festgestellt werden (vgl. Abb. 3). Dieses Ergebnis widerspricht den Resultaten von PONGRACZ et al. (1995). Denen zufolge war dem γ-Tocopherol *in vitro* das höchste antioxidative Potential zuzuschreiben, bei *in vivo* Versuchen war dagegen das α-Tocopherol am effizientesten. KRIEG (1992) bezeichnet α-Tocopherol als „wichtigstes fettlösliches Antioxidans in biologischen Systemen". SCHMIDT und KUNERT (1987) sehen es als den in Biomembranen effektivsten Radikalfänger an. α-Tocopherol kann auf vielfältige Art und Weise Membranlipide und andere zelluläre Substanzen vor oxidativ bedingten Schädigungen schützen. Zum einen kann es in einer destruktiven Reaktion Sauerstoffradikale desaktivieren, indem das Tocopherol nach Überführen in ein Tocopherylradikal unter anschließender Bildung und nachfolgendem Zerfall von Hydroperoxydienon in verschiedene Chinone umgewandelt wird (FRYER 1992). Zum anderen kann es in einer halbdestruktiven Quenching-Reaktion Singulett-Sauerstoff, der oft einen Initiator der Radikalbildung darstellt, ca. 120-mal inaktivieren, bevor es selbst zerstört wird. Die dritte Möglichkeit stellt eine Reaktion mit Peroxyradikalen dar, indem am Chromanonring ein H-Atom abstrahiert wird (FRYER 1992). Das dabei entstehende Tocopherylradikal ist nicht so reaktiv, daß es mit einer weiteren Fettsäure reagieren könnte. Es vermag jedoch in einer Folgereaktion ein zweites Peroxyradikal zu inaktivieren, so daß es zu einer Kettenabbruchreaktion kommt (WINSTON 1990, FRYER 1992, HESS 1993). Vermutlich ist das in biologischen Systemen hohe antioxidative Potential, welches α-Tocopherol im Vergleich zu anderen Stoffen mit Radikalfängerwirkung aufweist (SCHMIDT und KUNERT 1987), auf die verschiedenen Wechselwirkungen mit Substanzen zurückzuführen, die sowohl Ursache der Peroxyradikalbildung als auch der Radikalkettenreaktion sind. Bei Zusatz zu Lebensmitteln (z.B. Margarine) wird α-Tocopherol hinsichtlich der Antioxidativität vom γ-Tocopherol deutlich übertroffen (PONGRACZ et al. 1995). Dies ist anhand des Reaktionsmechanismus zu erklären. Entsprechende Untersuchungen wurden von GROSCH (1988) und ISHIKAWA (1982) an den Modellsubstanzen α-CXOH und γ-CXOH durchgeführt. Diese Verbindungen unterscheiden sich von den Tocopherolen durch das Fehlen der isoprenoiden Seitenkette, welche durch eine Methylgruppe ersetzt wurde. Bei der Reaktion von α-CXOH und γ-CXOH entstehen unterschiedliche Reaktionsprodukte. Die Reaktion von α-CXOH verläuft

über ein p-Chinon, während aus dem γ-CXOH über die Zwischenstufe eines Chromanoxiradikals Diphenyletherdimere gebildet werden (PONGRACZ et al. 1995).

β-Carotin

An zweiter Stelle der Reihung zur antioxidativen Aktivität folgten die Carotinoide, unter denen dem β-Carotin die größte Bedeutung zukommt. Wie das α-Tocopherol ist das β-Carotin ein effektiver Quencher von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere von Singulettsauerstoff (BURTON und INGOLD 1984, LARSON 1988) und anderen freien Radikalen. Durch deren Inaktivierung kann die Pflanzenzelle vor den Auswirkungen eines oxidativen Stresses geschützt werden (WINSTON 1990, ELSTNER 1987, SCANDALIOS 1993, PALLETT und YOUNG 1993). Die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen hat Einfluß auf das Energieniveau des Carotinoids im Triplettzustand und somit auf den Grad der Antioxidativität gegenüber Singulettsauerstoff. Effektive Radikalfängerreaktionen finden nur statt, wenn das Energieniveau des Radikalfängers geringer ist als das von Singulettsauerstoff. Am wirksamsten sind diejenigen Carotinoide, die – wie β-Carotin- über 9 konjugierte Doppelbindungen verfügen (PALLETT und YOUNG 1993).

Ähnlich wie Tocopherol kann β-Carotin eine Lipidperoxidation stoppen, indem es ein H-Atom an das Lipidperoxyradikal abgibt und dadurch selbst in ein Radikal überführt wird. In den meisten Fällen ist dieses aufgrund seiner konjugierten Doppelbindungen zu einer Eigenstabilisierung befähigt. In den Fällen, wo ein besonders hoher Sauerstoff-Partialdruck vorliegt, reagiert es weiter zum Peroxyradikal (PALLETT und YOUNG 1993) und setzt im ungünstigsten Fall die Radikalkettenreaktion fort.

Phenole und Ascorbinsäure

An dritter Stelle der Reihe folgen die Phenole. Exemplarisch wurden zur Durchführung dieser Untersuchungen Gallussäure und Chlorogensäure verwendet. Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, daß Gallussäure ein höheres antioxidatives Potential aufweist als Chlorogensäure. Allerdings ist, wie auch bei der Ascorbinsäure, eine Abhängigkeit der antioxidativen Kapazität vom Reaktionsmedium zu berücksichtigen.

Die Messung des AP der Ascorbinsäure im Rahmen einer Simulationsreaktion für die in der Pflanze stattfindende Lipidperoxidation ergab einen vergleichsweise niedrigen Wert. In dem an dieser Stelle gemessenen Konzentrationsbereich hatte die Zugabe von Ascorbinsäure *in vitro* sogar eine prooxidative Wirkung zur Folge (SCHMITZ und NOGA unveröffentlichte Ergebnisse). Dies steht jedoch im Widerspruch zu Ergebnissen aus *in vivo* Untersuchungen. NISHIKIMI (1975) beschrieb die Ascorbinsäure als einen wichtigen Stoff bei der Entgiftung des Superoxid-Radikals. In *in vivo* Untersuchungen hatte die Ascorbinsäure eine hohe antioxidative Wirksamkeit. Eine mögliche Erklärung wäre, daß *in vitro* die hydrophile Ascorbinsäure aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit einen unzureichenden Zugang zu dem in diesem Testmedium in der lipophilen Phase lokalisierten β-Carotin hat und somit keine Kettenabbruchreaktion einleiten kann. Im Gegensatz dazu ist das antioxidative Potential der Ascorbinsäure *in vivo* um ein Vielfaches größer (LOEWUS 1988, KUNERT und DODGE 1988). Durch Abgabe von ein oder zwei Wasserstoffatomen wird sie oxidiert zu Monodehydroascorbinsäure (MDHA) bzw. Dehydroascorbinsäure (DHA). Diese Reaktionsprodukte sind nicht sehr reaktiv, können also im Organismus keine weitere Kettenreaktion induzieren (LOEWUS 1988). Das MDHA-Radikal zerfällt entweder in Ascorbinsäure und DHA oder es wird durch eine NAD(P)H-abhängige Monodehydroascorbat-Reduktase zu Ascorbinsäure reduziert (FOYER 1993). Auch DHA kann wieder zu Ascorbinsäure reduziert werden. Diese Reaktion wird von einer Dehydroascorbat-Reduktase mit Glutathion als Wasserstoffdonor katalysiert (HOSSAIN et al. 1984, FOYER 1993). Auch ist die geringe Antioxidativität der Ascorbinsäure *in vitro* möglicherweise auf das Fehlen von Stoffen zurückzuführen, die *in vivo* die Wirksamkeit der Ascorbinsäure unterstützen. So bezeichnet FOYER (1993) die Ascorbinsäure als einen guten Radikalfänger bei der Entgiftung von Wasserstoffperoxid. Allerdings kann diese Reaktion nur stattfinden, wenn eine Peroxidase zugegen ist. Durch Glutathion, NADPH und andere Substanzen kann die Ascorbinsäure wieder in die reduzierte Form überführt werden (FOYER 1993). Auch bei der Entgiftung von Superoxid, welches oftmals Initiator einer Radikalkettenreaktion ist, entsteht als Endprodukt Wasserstoffperoxid (NISHIKIMI 1975). Wird letzteres nicht durch weitere Reaktionen umgesetzt, wirkt es auf Zellmoleküle zerstörend, wie dies offensichtlich in dem gewählten experimentellen Ansatz unter Verwendung von β-Carotin der Fall war.

Antioxidative Potentiale der verschiedenen Blattextrakte

Die Untersuchungen haben bei Extrakten von *Malus domestica* und *Vitis vinifera* ein höheres AP ergeben als bei denen von *P. vulgaris*. Dies könnte auf die unterschiedliche Herkunft des Blattmaterials zurückzuführen sein. Während die Buschbohnenblätter von Pflanzen entnommen wurden, die im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen angezogen wurden, stammten die Apfel- und Rebblätter aus dem Freiland, wo sie verschiedensten Streßfaktoren ausgesetzt waren. Daß Streßeinflüsse eine vermehrte Bildung antioxidativer Komponenten auslösen können, ist in der Literatur dokumentiert (MORAN et al. 1994). Daneben könnten auch Unterschiede im Alter der Blätter für die Differenzen im AP verantwortlich sein. So steigt nach eigenen Untersuchungen (SCHMITZ und NOGA 2000) bei *P. vulgaris*-Primärblättern der Gehalt an α-Tocopherol mit zunehmendem Alter der Blätter deutlich an. Dies hätte eine Erhöhung des antioxidativen Potentials zur Folge. Außerdem könnten die Unterschiede der antioxidativen Potentiale auf artenspezifische Faktoren zurückzuführen sein, welche genetisch bedingt sind. Dies würde mit den Ergebnissen von CHEVOLLEAU et al. (1992) übereinstimmen. Die Autoren haben deutliche Unterschiede im AP von Extrakten verschiedener Pflanzenarten nachgewiesen.

Ermittlung des Beitrages der einzelnen Antioxidantien zum antioxidativen Gesamtpotential

Obwohl das Radikalfängerpotential des Tocopherol-Standards weitaus höher ist als das der übrigen untersuchten Antioxidantien, leistet Tocopherol in Apfel- und Rebblattextrakten einen geringeren Beitrag zum antioxidativen Gesamtpotential als β-Carotin. Die Apfel- und Rebblattproben wurden im Spätsommer entnommen (25. August und 8. September 1994). Die Untersuchungen der quantitativen Gehalte der Inhaltsstoffe haben gezeigt, daß zu diesem Zeitpunkt der endogene β-Carotingehalt in den Blättern relativ hoch war. Demzufolge lieferte β-Carotin aufgrund seines mengenmäßig höheren Vorkommens einen größeren Anteil zum antioxidativen Gesamtpotential des lipophilen Extrakts.

Der größte Beitrag zum antioxidativen Potential im methanolischen Extrakt (hydrophile Phase) wurde in diesem Testmedium von den phenolischen Verbindungen geleistet. Unberücksichtigt blieb allerdings in diesen Untersuchungen der Beitrag der enzymatischen Abwehrmechanismen zum AP wie der Superoxiddismutasen, der Katalasen oder Peroxidasen.

Wir danken Herrn Dr. Bausch und Herrn Dr. Glatzle, Hoffmann-La-Roche, Basel, für die Einweisung in die Tocopherolanalytik sowie für die konstruktiven Diskussionsbeiträge.

Literatur

ANONYMOUS 1972: IFU-Analysen Nr. 44, Seite 2.

ANONYMOUS 1995: Methoden der enzymatischen Bioanalytik und Lebensmittelanalytik. Boehringer Mannheim, Biochemica.

ARNOW, L. E. 1937: Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydrophenyl-alanine-tyrosine mixtures. J. Biol. Chem. **18**, 531–537.

BELITZ H. D. und W. GROSCH 1994: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer Verlag.

BURTON, G. W. und K. U. INGOLD 1984: β-Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. Sci. **224**, 569–573.

BUTT, V. S. 1980: Direct oxidases and related enzymes. The Biochemistry of Plants, Vol. 2. D. D. Davies (Ed.) Academic Press, Inc., New York, 81–123.

CHEVOLLEAU, S., A. DEDAL und E. UCCIANI 1992: Détermination de l'activité antioxydante d'extraits végétaux. Revue francaise de corps gras **39**, 3–8.

CROWE, L. K., R. JENESS und S. T. COULTER 1948: The reducing capacity of milk and milk products as measured by a modified ferricyanide method. J. Dairy Sci. **31**, 595–611.

DAVIES, B. H. 1970: Biochem. J. 116, 93–99; zitiert in: GOODWIN, T., 1976: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press, Inc., London, New York, San Francisco.

ELSTNER, E. F. 1987: Metabolism of activated oxygen species. The Biochemistry of Plant, Vol. 11. D.D. Davies (Ed.). Academic Press, Inc., New York, 253–315.

FOOTE, C. S., F. C. SHOOK und R. B. ABAKERLI 1984: Characterization of singlett oxygen. Methods in Enzymology, Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. L. Packer (Ed.) Academic Press, Inc., Orlando, 36–47.

FOYER, C. H. 1993: Ascorbic acid: In: Antioxidants in Higher Plants. R. G. ALSCHER, J. L. HESS (Eds.) CRC Press, Inc., Boca Raton, 31–58.

FRYER, M. J. 1992: The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α-tocopherol). Plant Cell and Environm. **15**, 381–392.

GOODWIN, T. W. 1966: The Carotenoids. In: Comparative Phytochemistry, T. SWAIN (Ed.). London, New York, 121–137.

GROSCH, W. 1988: Lebensmittel-Technologie. G. Thieme Verlag, Stuttgart **21**, 261–268.

HESS, J. L. 1993: Vitamin E, α-Tocopherol. Antioxidants in Higher Plants. R. G. ALSCHER, J. L. HESS (Eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton. 111–134.

HOSSAIN, M. A., Y. NAKANO and K. ASADA 1984: Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. Plant Cell Physiol. **25**, 385–395.

ISHIKAWA, Y. 1982: J. Amer. Oil Chem. Soc. **59**, 505–510; zitiert in: PONGRACZ, G., H. WEISER und D. MATZINGER 1995: Tocopherole – Antioxidantien in der Natur. Fat Sci. Technol. **97**, 90–103.

JONES, B. L. and J. W. Porter 1986: Biosynthesis of carotenes in higher plants. CRC Critical Reviews in Plant Sci. **3**, 295–324.

KÖHLER, W., G. SCHACHTEL und P. VOLESKE 1994: Biometrie. Springer-Verlag, Berlin.

KRIEG, F. 1992: Einfluß der Nährstoffversorgung auf die Ozonanfälligkeit der Weinrebe (Vitis vinifera L. cv. Pinot noir). Diss. ETH Zürich.

KUNERT, K. J. and A. D. DODGE 1988: Herbicide induced radical damage and antioxidative systems. Target sites of Herbicide Action. P. BÖGER, G. SANDERMANN (Eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, 45–63.

LARSON, R. A. 1988: The Antioxidants of Higher Plants. Phytochem. **27**, 969–978.

LOEWUS, F. A. 1980: L-Ascorbic acid: metabolism, biosynthesis, function. The Biochemistry of Plants, Vol. 3. J. PEISS (Ed.) Academic Press, Inc., New York, 77–99.

LOEWUS, F. A. 1988: L-Ascorbic acid and its metabolic products. The Biochemistry of Plants, Vol. 14. J. PEISS (Ed.) Academic Press, Inc., New York, 85–107.

MALLET, J. F., C. CERRATI, E. UCCIANI, J. GAMISANS und M. GRUBER 1994: Antioxidant activity of plant leaves in relation to their alpha-tocopherol content. Food Chem. **49**, 61–65.

MC MURROUGH, I. und G. P. HENNINGAN 1984: Tanning properties of flavanols in barley and hops. J. Inst. Brew. **90**, 24–32.

MÖRSEL, J. Th. 1990: Fortschrittsbericht Lipidperoxidation. Die Nahrung **34**, 3–12.

MORAN, J. F., M. BECANA, I. HURBE ORMAETEXE, S. FREDILLA, R. V. KLUCAS und P. TEJO-APARICIO 1994: Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta **194**, 1346–1352.

NISHIKIMI, M. 1975: Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. Biochim. Biophys. Res. Commun. **63**, 463–470.

PALLET, K. E. und A. J. YOUNG 1993: Carotenoids. Antioxidants in Higher Plants. R. G. ALSCHER, J. L. HESS (Eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, 59–90.

PONGRACZ, G., H. WEISER und D. MATZINGER 1995: Tocopherole – Antioxidantien in der Natur. Fat Sci. Technol. **97**, 90–103.

SCANDALIOS, J. G. 1993: Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiol. **101**, 7–12.

SCHMIDT, A. and K. J. KUNERT 1987: Antioxidative systems: defense against oxidative damage in plants. In: UCLA symposia on molecular and cellular biology (USA). Molecular Strategies for Crop Protection. C. J. ARNTZEN, C. RYAN (Eds.). Alan R. Liss, Inc. **14**, 401–413.

SCHMITZ, M. und G. NOGA 1998: Antioxidative potential of selected plant components. In: Antioxidants in Higher Plants: Biosynthesis, Characteristics, Actions and specific Functions in Stress Defence; Shaker-Verlag, Aachen, ISBN 3-8265-4418-8, 62–71.

SCHMITZ, M. und G. NOGA 2000: Penetration and translocation of exogenous applied tocopherol, investigated on Phaseolus vulgaris and Vicia faba leaves. (in preparation)

TSUDA, T., M. WATANABE, K. OHSHIMA, S. NORINOBU, S. CHOI, S. KAWAKISHI und G. W. WINSTON 1994: Physiochemical basis for free radical formation in cells. Production and defenses. Stress responses in plants: Adaption and acclimation mechanisms. Wiley-Liss. Inc., 57–86.

WINSTON, G. W. 1990: Physiochemical basis for free radical formation in cells: In: Production and defenses. In: Stress responses in plants: Adaption and acclimation mechanisms. Wiley-Liss., Inc., 57–86.

Eingegangen: 20.8.1998/10.5.1999

Anschrift der Verfasser: Dr. Michaela Schmitz, Prof. Dr. G. Noga, Institut für Obstbau und Gemüsebau, Auf dem Hügel 6, 53121 Bonn, Germany.