



LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE  
*LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE*

PĀRTIKAS TEHNOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
*FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY*

**Lolita Tomsone**  
*Mg. oec.*

**MĀRRUTKU UN LUPSTĀJU BIOLOĢISKI AKTĪVO  
VIELU IZPĒTE**

***INVESTIGATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN  
HORSERADISH AND LOVAGE***

Promocijas darba kopsavilkums  
inženierzinātņu doktora zinātniskā grāda iegūšanai  
pārtikas zinātnes nozarē

*Summary of promotion work for acquiring  
the Doctor's degree of Engineering Sciences  
in sector of Food Sciences*

Autore / Author \_\_\_\_\_

Jelgava  
2015

Promocijas darba vadītāja /

*Scientific supervisor:*

Vad.pētniece, *Dr. sc. ing.* **Zanda Krūma**

Oficiālie recenzenti / *Official reviewers:*

Prof., *Dr.habil.sc.ing.* **Imants Atis Skrupskis** (Latvijas Lauksaimniecības universitāte, Pārtikas Tehnoloģijas fakultāte, Latvija / *Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology, Latvia*)

Pētniece / *Researcher, Dr.biol.* **Dace Tirzīte** (Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Latvija / *Latvia Institute of Organic Synthesis, Latvia*)

Asoc. prof., *Dr.chem.* **Ida Jākobsone** (Latvijas Universitāte, Ķīmijas fakultāte, Latvija / *Latvia University, Faculty of Chemistry, Latvia*)

Darba izstrāde veikta ar Valsts pētījumu programmas „Lauksaimniecības resursi ilgtspējīgai kvalitatīvas un veselīgas pārtikas ražošanai Latvijā (AgroBioRes)” (2014.-2017.), projekta Nr. 4. „Vietējo lauksaimniecības resursu ilgtspējīga izmantošana kvalitatīvu un veselīgu pārtikas produktu izstrādei (PĀRTIKA)”, kā arī Francijas un Latvijas sadarbības programmas zinātnes un tehnoloģiju attīstības jomās “OSMOZE” projekta Nr. K24 „Latvijas un Vidus Pireneju aromātisko pašlaik neizmantoto aromātisko augu un sēņu sastāva un īpašību salīdzinājums” (2012. – 2013.) atbalstu.

*Doctoral thesis has been worked out by support of State Research Programme „Sustainable use of local agricultural resources for development of high nutritive value food products (Food)” within the National Research Programme “Sustainable use of local resources (earth, food, and transport) – new products and technologies (NatRes) (VPP2014-2017)”, as well as Project No. K24 “Comparison of Content and Properties of Currently Unused Aromatic Plants and Mushrooms in Latvia and Midi-Pirenees” (2012.–2013.) within the framework of the cooperation programme between Latvia and France in science and technology development areas “OSMOZE”.*

**Promocijas darba aizstāvēšana notiks** LLU Pārtikas zinātnes nozares promocijas padomes atklātajā sēdē 2015. gada 12. jūnijā plkst. 10<sup>00</sup> 145. auditorijā Pārtikas tehnoloģijas fakultātē, Lielajā ielā 2, Jelgavā.

*The defence of the thesis in open session of the Promotion Board of Food Science will be held on June 12, 2015, at 10<sup>00</sup> in auditorium 145, at the Faculty of Food Technology of LUA, Liela street 2, Jelgava.*

Ar promocijas darbu un kopsavilkumu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā Lielajā ielā 2, Jelgavā, LV–3001, un internetā (pieejams: <http://llu.fb.llu.lv/llu-theses.htm>). Atsauksmes sūtīt Pārtikas zinātnes nozares promocijas padomes sekretārei LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātes docentei *Dr. sc. ing.* **I. Beitānei** (Lielā ielā 2, Jelgava, LV–3001, e-pasts: [ilze.beitane@llu.lv](mailto:ilze.beitane@llu.lv)).

*The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Liela street 2, Jelgava, LV–3001, and on internet: <http://llu.fb.llu.lv/llu-theses.htm>. References are welcome to send to *Dr. sc. ing. I. Beitānei*, the Secretary of the Promotion Board in sector of Food Science at LUA, Faculty of Food Technology, Liela street 2, Jelgava, LV–3001, Latvia, or e-mail: [ilze.beitane@llu.lv](mailto:ilze.beitane@llu.lv).*

**ISBN 978-9984-48-194-4 (online)**

## SATURS

<b>PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE</b> .....	4
<b>ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA</b> .....	7
<b>MATERIĀLI UN METODES</b> .....	10
<b>PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA</b> .....	14
1. Nozīmīgāko bioloģiski aktīvo savienojumu un to antioksidatīvās aktivitātes izvērtējums mārrutkos un lupstājos.....	14
2. Bioloģiski aktīvo savienojumu satura un antioksidantu aktivitātes izmaiņas mārrutkos un lupstājos tehnoloģisko procesu ietekmē.....	18
3. Ekstrakcijas apstākļu ietekmes izvērtējums uz bioloģiski aktīvo savienojumu saturu mārrutku un lupstāju ekstraktos.....	21
4. Mārrutku un lupstāju ekstraktu ietekmes uz eļļas oksidēšanās kavēšanu izvērtējums.....	29
<b>SECINĀJUMI</b> .....	34
<b>IETEIKUMI RAŽOTĀJIEM</b> .....	34

## CONTENT

<b>TOPICALITY OF THE RESEARCH</b> .....	35
<b>APPROBATION OF THE RESEARCH</b> .....	38
<b>MATERIALS AND METHOD</b> .....	38
<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	40
1. Assessment of horseradish and lovage main bioactive compounds and their antioxidative activity.....	40
2. Comparison of biologically active compounds of horseradish and lovage and assessment of their antioxidative activity affected by treatment.....	41
3. Comparison of biologically active compounds of horseradish and lovage and assessment of their antioxidative activity affected by condition of extraction.....	42
4. Horseradish and lovage extract additive impact assessment of the oil oxidation inhibition.....	45
<b>CONCLUSION</b> .....	47
<b>RECOMMENDATIONS FOR MANUFACTURERS</b> .....	47

## PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Mūsdienās, patērētājiem kļūstot arvien zinošākiem par dabiskas izcelsmes bioloģiski aktīvo savienojumu lietošanu, tuvākajā nākotnē šie savienojumi var iegūt ievērojamu ekonomisko nozīmi. Pēdējos gados ir novērota pieaugoša interese par augu izcelsmes piedevām (Brielman et al., 2006), liela uzmanība un centieni bijuši veltīti pētījumiem, kuru mērķis ir atrast jaunus dabīgas izcelsmes antioksidantus, kas darbojas tikpat efektīvi kā sintētiskie antioksidanti (Pokorny, 2007; Michiels et al., 2012). Līdz ar to gan tiek meklēti jauni, gan apzināti vietējie, katram reģionam raksturīgie, bet plaši neizmantojie augi.

Latvijā ir atrodams plašs spektrs dažādu augu, daļa no tiem sastopami tikai savvaļā, bet daļa tiek kultivēti. Mārrutki (*Armoracia rusticana* L, dzimta: *Brassicaceae*) un lupstāji (*Levisticum officinale* L, dzimta: *Umbelliferae*) ir tipiski Latvijas aromātiskie augi, kuri nav prasīgi attiecībā uz audzēšanas apstākļiem. Mārrutki ir samērā populāri arī mūsdienās, bet lupstāju popularitāte ir samazinājusies. Šie augi izsenis tika izmantoti kā ārstniecības augi ar plašu lietojumu dažādu slimību ārstēšanai (Raghavan, 2000). Ir plaši pētījumi, kas apliecina, ka citi šo dzimtu augi (kāposti, rāceņi, rapši, kāļi, sinepes, rutki, redīsi, pērkones u.c., kā arī dilles, pētersīļi, selerijas, koriandri, ķīmenes, fenhelis, gārša u.c.) satur daudzas bioloģiski aktīvas vielas ar antioksidatīvām, antimikrobiālām un antikancerogēnām īpašībām.

Daudzi no bioloģiski aktīvajiem savienojumiem, kā fenoli (fenolskābes, flavonoidi, flavoni), ēteriskās eļļas un citi, ir plaši sastopami augos (Naczka, Shahidi, 2004a). Bioloģiski aktīvo savienojumu funkcijas un sastāvs var svārstīties atkarībā no augu sugas, šķirnes, genotipa, paveida, novākšanas laika, auga daļas, kā arī klimatiskajiem apstākļiem (Naczka, Shahidi, 2006). Atsevišķi šie savienojumi vairāk sintezējas mērenā klimatā, kāds tas ir mūsu platuma grādos, kaut gan garšaugi var būt mazāk aromātiski, bet toties bagātāki ar bioloģiski aktīvajām vielām.

Neraugoties uz to, ka nav plašu pētījumu par mārrutku un lupstāju ķīmisko sastāvu, ir pamats domāt, ka arī šie augi satur antioksidantus, kurus nepieciešams izpētīt.

Augu ķīmiskais sastāvs spēj mainīties tehnoloģisko procesu (kaltēšana, saldēšana) ietekmē (Angela, Meireles, 2009). Literatūrā tikpat kā nav sastopami dati par mārrutku un lupstāju apstrādi mikroviļņu-vakuuma, kā arī sublimācijas kaltē. Svarīgi, ka, kaltējot pārtikas produktus šāda tipa kaltēs, ir iespējams lietot zemas apstrādes temperatūras, kā rezultātā samazinās bioloģiski aktīvo savienojumu termiskā degradācija.

Dažas bioloģiski aktīvo savienojumu klases uzrāda antioksidantu aktivitāti (AA) (Dykes, Rooney, 2007), un tos var izmantot kā oksidēšanos kavējošas vielas jeb antioksidantus (Halliwell, 1999; Shahidi, 2000; Zou, Akoh, 2015; Kim et al., 2015). No uzturzinātnes un tehnoloģiju viedokļa, lai kontrolētu oksidāciju, nodrošinot atbilstošu pārtikas kvalitāti, ir ļoti vēlams pievienot antioksidantus (Pokorny, 2007).

Bioloģiski aktīvos savienojumus ietekmē arī ekstrakcijas apstākļi (Angela, Meireles, 2009), un to izolēšanai no augu materiāla tiek lietotas arvien jaunas, modernākas ekstrakcijas metodes – ultraskaņas veicināta ekstrakcija (UAE),

mikroviļņu veicināta ekstrakcija (MAE), paātrinātā ekstrakcija (ASE), virskritiskā stāvokļa ekstrakcija, kā arī zemkritiskā stāvokļa ekstrakcija (SUB). Tām, salīdzinot ar tradicionālajām ekstrakcijas metodēm, ir īsāks ekstrakcijas laiks, zemāka ekstrakcijas temperatūra, mazāks ekstrakcijas šķīdinātāju tilpums, selektivitāte utt., kas ļauj palielināt vēlamu savienojumu ekstrakcijas iznākumu un mazināt to dažāda veida degradāciju.

Tā kā fenoliem ir antioksidantu un antimikrobiālās īpašības, tos iespējams izmantot kā alternatīvu sintētiskajiem antioksidantiem. Tie izrāda aizsardzības un stabilizējošu ietekmi uz lipīdiem, pārtikas produktu krāsu un garšu. Fenolu savienojumiem ir liela strukturālā daudzveidība, kas atspoguļojas arī to atšķirīgajās bioloģiskajās funkcijās. Tādējādi augu ekstraktiem, kas atšķiras pēc to fenolu profila, var būt dažādi fizioloģiskie efekti (Valls et al., 2009; Kammerer et al., 2011).

Pētījumiem par pievienoto augu ekstraktu efektivitāti lipīdu stabilizēšanā pēdējos gados ir pievērsta liela uzmanība, un tādu plaši pazīstamu garšaugu kā oregano un rozmarīna ekstrakti ir izrādījušies ļoti efektīvi (Bhale et al., 2007; Pawar et al., 2012). Līdz ar to ir svarīgi izpētīt vietējo augu īpašības un atrast iespējas to izmantošanai pārtikas produktu kvalitātes uzlabošanai.

Promocijas darba **hipotēze** – mārrotkos un lupstajos esošie antioksidanti kavē lipīdu oksidēšanos.

Promocijas darba **mērķis** ir izvērtēt mārrotku un lupstāju bioloģiski aktīvās vielas, to ekstrakcijas un izmantošanas iespējas.

Promocijas darba pētījuma **objekts** ir Latvijā audzēti mārrotki (*Armoracia rusticana* L.) un lupstāji (*Levisticum officinale* L.).

Promocijas darba hipotēzi pierāda ar šādām **tēzēm**:

1. genotips, auga daļa un novākšanas laiks ietekmē mārrotku un lupstāju ķīmisko sastāvu;
2. saldētos mārrotkos un lupstajos saglabājas augstāks fenolu saturs un antioksidantu aktivitāte nekā kaltētos;
3. polāru šķīdinātāju izmantošana paaugstina flavonoīdu saturu un antioksidantu aktivitāti mārrotku un lupstāju ekstraktos;
4. mikroviļņu un ultraskaņas viļņu iedarbības laiks ietekmē fenolu saturu un antioksidantu aktivitāti mārrotku un lupstāju ekstraktos;
5. paaugstināta temperatūra un spiediens palielina fenolu saturu un antioksidantu aktivitāti mārrotku un lupstāju ekstraktos;
6. mārrotku un lupstāju ekstrakti ir efektīvāki antioksidanti nekā butilhidroksitoluols (BHT).

### Pētījuma **uzdevumi**:

1. analizēt dažāda genotipa mārrutku un lupstāju augu daļu ķīmiskā sastāva izmaiņas atkarībā no novākšanas laika;
2. izvērtēt optimālos svaigu mārrutku un lupstāju apstrādes veidus fenolu savienojumu un antioksidantu aktivitātes saglabāšanai;
3. analizēt šķīdinātāja polaritātes ietekmi uz fenolu savienojumu saturu un antioksidantu aktivitāti mārrutku un lupstāju ekstraktos;
4. izvērtēt mikroviļņu un ultraskaņas viļņu iedarbības ilguma ietekmi uz fenolu savienojumu saturu un antioksidantu aktivitāti mārrutku un lupstāju ekstraktos;
5. analizēt paaugstinātas temperatūras un spiediena ietekmi uz fenolu savienojumu saturu un antioksidantu aktivitāti mārrutku un lupstāju ekstraktos;
6. pētīt mārrutku un lupstāju ekstraktu ietekmi uz nerafinētas rapšu eļļas oksidēšanos.

### Promocijas darba **novitāte** un **zinātniskais** nozīmīgums.

1. Pirmoreiz veikti detalizēti pētījumi par Latvijā audzētu dažādu genotipu mārrutku un lupstāju dažādu augu daļu ķīmisko sastāvu atkarībā no novākšanas laika.
2. Izpētītas mārrutku un lupstāju fenolu savienojumu (rutīna, kafijskābes, hlorogēnskābes, katehīna u.c.) satura izmaiņas apstrādes procesu (saldēšanas, kaltēšanas mikroviļņu-vakuuma kaltē, sublimācijas) ietekmē.
3. Pētīta dažādu šķīdinātāju, ultraskaņas un mikroviļņu ietekmes ilguma, kā arī zemkritiskā stāvokļa un paātrinātās ekstrakcijas ietekme uz fenolu savienojumu saturu un dabīgo antioksidantu aktivitāti mārrutku un lupstāju ekstraktos.
4. Ir pierādīts, ka mārrutki un lupstāji ir potenciāls dabīgo antioksidantu ieguves avots.

Promocijas darba **tautsaimnieciskā** nozīme. Latvijā audzētie mārrutki un lupstāji satur bioloģiski aktīvus savienojumus, kuri ir izmantojami ar dabīgiem antioksidantiem bagātu ekstraktu ieguvei. Mārrutku lapu, lupstāju lapu un kātu ekstrakti ir efektīvāki nerafinētas rapšu eļļas oksidēšanās kavētāji nekā sintētiskais antioksidants butilhidroksitoluols (BHT).

## ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

**Pētījumu rezultāti apkopoti un publicēti 2 monogrāfijas apakšnodaļās, 11 recenzējamās zinātniskajās izdevumos.**

### **Monogrāfijas apakšnodaļas – 2**

1. Krūma Z., **Tomsone L.** (2012) Fenolu savienojumi citos augu valsts produktos. No: *Bioloģiski aktīvās vielas pārtikas produktos*. Red.: Straumīte E., Galoburda R., Krūma Z., Ciproviča I., Zagorska J. Jelgava: LLU, PTF, 205.–206. lpp.
2. Krūma Z., **Tomsone L.** (2012) Fenolu savienojumu ekstrakcija. No: *Bioloģiski aktīvās vielas pārtikas produktos*. Red.: Straumīte E., Galoburda R., Krūma Z., Ciproviča I., Zagorska J. Jelgava: LLU, PTF, 206.–207. lpp.

### **Publikācijas – 11**

1. **Tomsone L.**, Kruma Z. (2015) Stability of rapeseed oil with horseradish *Armoracia rusticana* L. and lovage *Levisticum officinale* L. extracts under medium temperature accelerated storage conditions. In: 6th International Conference „Biosystems Engineering 2015” Agronomy Research, Estonia, Tartu. (*Akceptēts publicēšanai*)
2. **Tomsone L.**, Kruma Z., Talou T., Zhao T. M. (2015) Natural antioxidants of horseradish and lovage extracted by accelerated solvent extraction. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, Vol. 10, p. 16–24. [Electronic resource].
3. **Tomsone L.**, Kruma Z. (2014) Influence of freezing and drying on the phenol content of horseradish and lovage. **In:** *FOODBALT-2014: 9th Baltic conference on food science and technology „Foof for consumer well-being”*: conference proceedings, 8-9 May, 2014, Jelgava, Latvia University of Agriculture. Faculty of Food Technology. Jelgava: LLU, p. 192–197.
4. **Tomsone L.**, Kruma Z. (2013) Comparison of different extraction methods for isolating phenolic compounds from lovage (*Levisticum officinale* L.) seeds. **In:** *Proceedings of the XI International Scientific Conference «Innovations in Science, Education and Business- 2013»*, Russia, Kaliningrad, p. 194–197. [CD].
5. **Tomsone L.**, Kruma Z., Galoburda R., Dimins F., Kreicbergs V. (2013) Influence of technological processes on the phenol content and antioxidant properties of horseradish roots (*Armoracia rusticana* L.). **In:** *Proceedings of the ICNFS Nutrition and Food Sciences*, Russia, Moscow, p. 6–10.
6. **Tomsone L.**, Kruma Z., Galoburda R., Talou T. (2013) Composition of volatile compounds of horseradish roots (*Armoracia rusticana* L.) depending on genotype. **In:** *Proceedings of Latvia University of Agriculture, 2013*, vol.29, issue 1, (324), p. 1–10. DOI: 10.2478/plua-2013-0001 [Electronic resource].
7. **Tomsone L.**, Kruma Z. (2013) Comparison of different methods for extraction of bioactive compounds from lovage (*Levisticum officinale* L.) roots.

**In:** *Proceedings of FaBE 2013 International Conferences on Food and Biosystems Engineering*, Greece, Skiathos Island, p. 225–235. [CD].

8. **Tomsone L.,** Kruma Z. (2013) Comparison of different solvents for isolation of phenolic compounds from horseradish (*Armoracia rusticana* L.) leaves. **In:** *Proceedings of conference Research for Rural development 2013*, Latvia, Jelgava, p. 104–110.
9. **Tomsone L.,** Kruma Z., Alsina I., Lepse L. (2012) The application of hierarchical cluster analysis to classify genotypes of horseradish (*Armoracia rusticana* L.) roots. ISSN 1392 – 1231. *Chemine Technologija*. 2012. Vol. 62 (4), p. 52–56. DOI: doi.org/10.5755/j01.ct.62.4.3410 [Electronic resource].
10. **Tomsone L.,** Kruma Z., Lepse L. (2012) Influence of genotype and harvest time on the phenolic content of horseradish (*Armoracia rusticana* L.) roots. **In:** *Proceedings of conference Research for Rural development 2012*, Latvia, Jelgava, p. 124–130 (Scopus datubāze / database).
11. **Tomsone L.,** Kruma Z., Galoburda R. (2012) Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from horseradish roots (*Armoracia rusticana*). *World Academy of Science, Engineering and Technology*, Issue 67, p. 903–908. [CD].

Par rezultātiem ziņots **14 starptautiskajās zinātniskajās konferencēs** un kongresos Latvijā, Lietuvā, Igaunijā, Grieķijā, Portugālē, Francijā, Maķedonijā, kā arī Krievijā, izstādē „Riga Food 2013”, „Riga Food 2014”.

1. **Tomsone L.,** Kruma Z. (2015) Stability of rapeseed oil with horseradish *Armoracia rusticana* L. and lovage *Levisticum officinale* L. extracts under medium temperature accelerated storage conditions. 6th International Conference „Biosystems Engineering 2015”. Tartu, Igaunija, 2015. gada 7.–8. maijā. (stenda referāts / poster presentation)
2. **Tomsone L.,** Kruma Z., Talou T., Zhao T.M. (2014) „Natural antioxidants of horseradish and lovage extracted by accelerated solvent extraction”. Conference Nutricon 2014, Skopje, Maķedonija, 2014. gada 27.–28. novembrī (mutiskais referāts / oral presentation).
3. **Tomsone L.,** Kruma Z. (2014) „Influence of freezing and drying on the phenol content of horseradish and lovage”. 9th Baltic Conference on Food Science and Technology, “Food, Health and Well-being”, Jelgava, Latvija, 2014. gada 8.–9. maijā (stenda referāts / poster presentation).
4. **Tomsone L.,** Kruma Z. (2013) “Comparison of different extraction methods for isolating phenolic compounds from lovage (*Levisticum officinale* L.) seeds”. XI International Scientific Conference «Innovations in Science, Education and Business – 2013», Kaļiņingrada, Krievija, 2013. gada 25.–27. septembrī (mutiskais referāts / oral presentation).



5. **Tomsone L.**, Kruma Z. (2013) „Comparison of different methods for extraction of bioactive compounds from lovage (*Levisticum officinale* L.) roots”. International Conference on Food and Biosystems Engineering, Skiatos sala, Griekija, 2013. gada 30. maijs – 2. jūnijs (stenda referāts / *poster presentation*).
6. **Tomsone L.**, Kruma Z., Galoburda R. (2013) „Comparison of different extraction methods for isolating phenolic compounds from lovage (*Levisticum officinale* L.) leaves and stems”. 8th Baltic Conference on Food Science and Technology, “Food, Helth and Well-being”, Tallina, 2013. gada 23.–24. maijā (stenda referāts / *poster presentation*).
7. **Tomsone L.**, Kruma Z., Sarvi S., Udača L. (2013) „Phenolic compounds as natural antioksidants of laovage”. 8th International Scientific Conference “Students on their Way to Science”, Jelgava, 2012. gada 24. maijā (mutiskais referāts / *oral presentation*).
8. **Tomsone L.**, Kruma Z. (2013) „Comparison of different solvents for isolation of phenolic compounds from horseradish (*Armoracia rusticana* L.) leaves”. Annual 19th International Scientific Conference „Research for Rural Development”, Jelgava, 2013. gada 15.–17. maijā (mutiskais referāts / *oral presentation*).
9. **Tomsone L.**, Kruma Z., Talou T., Galoburda R. (2012) Composition of volatile compounds of horseradish roots (*Armoracia rusticana* L.) depending on genotype. 43rd International Symposium on Essential Oils (ISEO2012), Lisabona, 2012. gada 5.–8. septembrī (stenda referāts / *poster presentation*).
10. **Tomsone L.**, Kruma Z., Talou T., Galoburda R. (2012) „Microwave and ultrasound – assisted extraction of polyphenols from horseradish (*Armoracia rusticana* L.) roots”. 8th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Tulūza, Francija, 2012. gada 4.–6. jūnijā (stenda referāts / *poster presentation*).
11. **Tomsone L.**, Kruma Z. (2012) „Vitamin C as natural antioxidant of horseradish”. 7th International Scientific Conference “Students on their Way to Science”, Jelgava, 2012. gada 25. maijā (mutiskais referāts / *oral presentation*).
12. **Tomsone L.**, Kruma Z., Alsina I., Lepse L. (2012) „The application of hierarchical cluster analysis to clasify genotypes of horseradish (*Armoracia rusticana* L.) roots”. 7th Baltic Conference on Food Science and Technology, “Innovative and healthy food for consumers”, Kauņa, Lietuva, 2012. gada 17.–18. maijā (stenda referāts / *poster presentation*).
13. **Tomsone L.**, Kruma Z., Lepse L. (2012) „Influence of genotype and harvest time on the phenolic content of horseradish (*Armoracia rusticana* L.) roots”. Annual 18th International Scientific Conference „Research for Rural Development”, Jelgava, 2012. gada 18.–20. maijā (mutiskais referāts / *oral presentation*).
14. **Tomsone L.**, Kruma Z., Galoburda R. (2012) „Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from horseradish roots (*Armoracia rusticana*)”. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, Francija, Paīze, 2012. gada 24.–27. aprīlī (mutiskais referāts / *oral presentation*).

## MATERIĀLI UN METODES

### Pētījuma laiks un vieta

Ekspierimenti veikti no 2011. līdz 2015. gadam:

- LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātes Pārtikas tehnoloģijas katedras Pārtikas produktu analīžu laboratorijā (mitruma saturs) un Iepakojuma materiālu īpašību izpētes laboratorijā (gaistošo savienojumu saturs), Ķīmijas katedras Dabas vielu ķīmijas zinātniskajā laboratorijā (atsevišķo fenolu savienojumu noteikšana) un Organiskās ķīmijas laboratorijā (ekstraktu gatavošana pēc konvencionālās metodes, Soksleta metodes, mikroviļņu veicinātās un ultraskaņas veicinātās ekstrakcijas, kā arī kopējais fenolu saturs (KFS), kopējais flavonoīdu saturs (KFIS), antiradikālās aktivitātes (ArA) (2,2-difenil-1-pikrilhidrazils - DPPH<sup>•</sup>, 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonskābe) - ABTS<sup>•+</sup>) un reducēšanas spējas (RS) noteikšana);
- Tulūzas Nacionālā politehniskā institūta Agro-Industrijas ķīmijas laboratorijā (paātrinātā un zemkritiskā stāvokļa ekstrakcijas).

### Pētījumā izmantotie materiāli

Ekspierimentiem tika izmantoti AS „Pūres dārzkopības pētījumu centrs” audzēti mārrotku un dažādos Latvijas reģionos audzēti lupstāju genotipi, kas ievākti 2011., 2012. un 2013. gadā no jūnija līdz novembrim (katrā pētījumā izmantotais augu materiāls parādīts pētījumu aprakstā, konkrētais novākšanas laiks – pie pētījumu posmu apraksta). Augu materiāls tika novākts un pēc tam 1–2 nedēļas uzglabāts ledusskapī +4±1 °C temperatūrā ar gaisa relatīvo mitrumu 90–95%. Pētījumā izmantoti 12 mārrotku (G1, G2, G3, G12B, G26B, G104, G105, G106, G280, G281, GM un GJ) un 4 lupstāju (L1, L2, L3 un L4) genotipi.

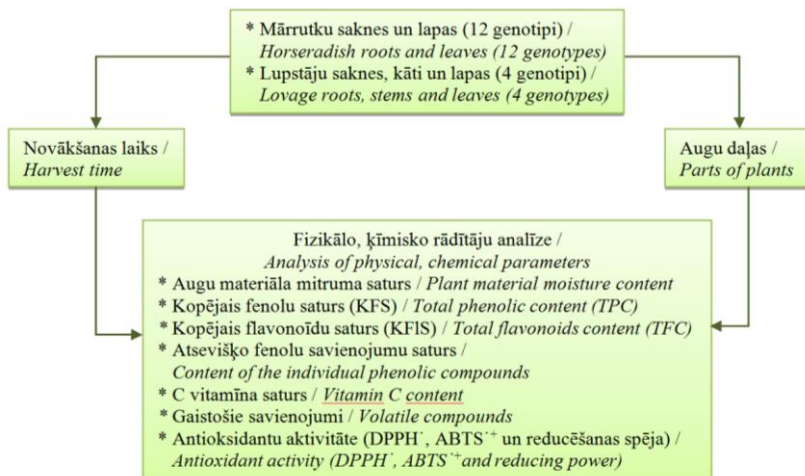
Pētījumā par mārrotku lapu, lupstāju lapu un lupstāju kātu ekstraktu spēju stabilizēt eļļu uzglabāšanas laikā izmantoja SIA „Iecavnieks” (Latvija) nerafinētu rapšu eļļu. Eļļa iepakota caurspīdīgās plastmasas (PET) pudelēs (tilpums 5 L).

### Pētījuma struktūra

Pētījums veikts četros posmos, kuros analizēti svaigu un apstrādātu mārrotku un lupstāju fizikālie un ķīmiskie rādītāji, ekstrakcijas apstākļu ietekme, kā arī ekstraktu ietekme uz eļļas stabilitāti.

#### I posms: mārrotku un lupstāju bioloģiski aktīvo savienojumu izvērtējums

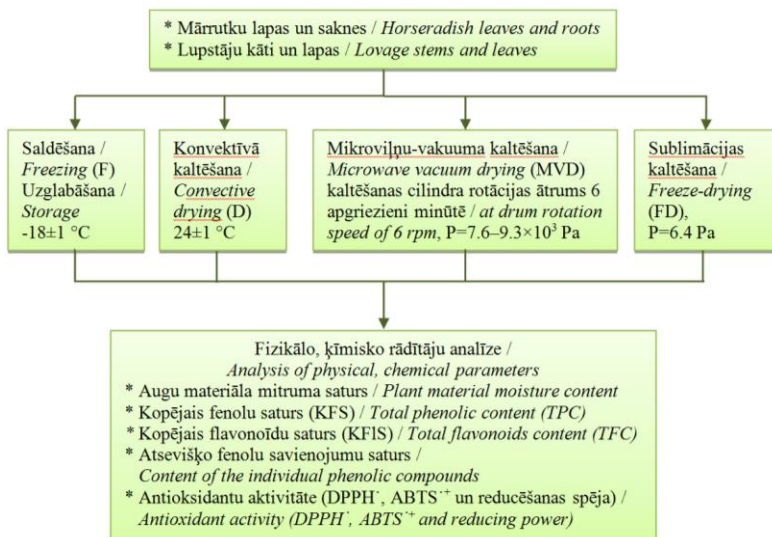
Pirmajā posmā tika analizēta novākšanas laika un auga daļas ietekme uz dažādu genotipu mārrotku un lupstāju sastāvā esošajiem bioloģiski aktīvajiem savienojumiem. Pētījuma 1. posma shēma ir parādīta 1. attēlā.



**1.att. Pētījuma pirmā posma struktūra /  
Fig.1. Structure of the first stage of experiment**

## II posms: mārrutku un lupstāju bioloģiski aktīvo savienojumu izvērtējums atkarībā no to apstrādes veida

Pētījumā tika analizēta saldēšanas un kaltēšanas ietekme uz mārrutku un lupstāju sastāvā esošo fenolu savienojumu saturu un AA (2. att.).

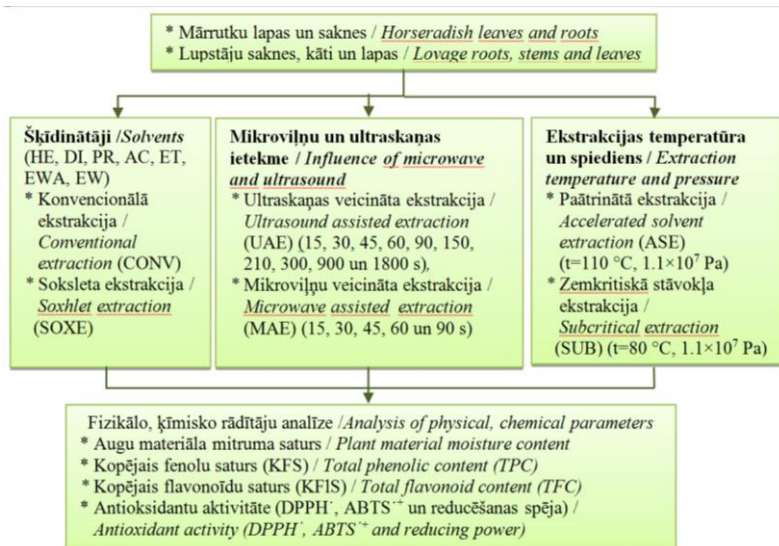


**2. att. Pētījuma otrā posma struktūra /  
Fig. 2. Structure of the second stage of experiment**

Kā kontrole tika analizēti svaigie augu materiālu paraugi.

### III posms: ekstrakcijas apstākļu ietekmes izvērtējums

Pētījumā tika analizētas fenolu savienojumu saturs un AA izmaiņas ekstraktos dažādu ekstrakcijas parametru (šķīdinātāja, mikroviļņu, ultraskaņas, temperatūras un spiediena) ietekmē (3. att.). Eksperimentos tika izmantotas sešas ekstrakcijas metodes: konvencionālā (CONV), Soksleta (SOXE), ultraskaņas veicināta (UAE), mikroviļņu veicināta (MAE), paātrinātā (ASE) un zemkritiskā stāvokļa (SUB) ekstrakcija.



3. att. Pētījuma trešā posma struktūra /  
Fig. 3. Structure of the third stage of experiment

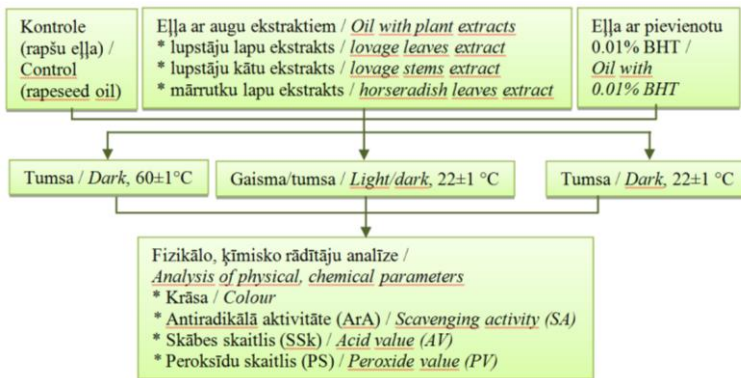
HE – n-heksāns / n-hexane; DI – dietilēteris / diethylether; PR – 2-propanols / 2-propanol; AC – acetons / acetone; ET – etanols / ethanol; EWA – etanols/ūdens/etiķskābe / ethanol/water/acetic acid (80/20/1 v/v/v); EW – etanols/ūdens / ethanol/water (80/20 v/v).

### IV posms: ekstraktu ietekmes uz eļļas stabilitāti izvērtējums

Kopējā pētījuma shēma ir parādīta 4. attēlā. Nerafinētai rapšu eļļai pievienoja trīs dažādus ekstraktus – lupstāju lapu ekstraktu, lupstāju kātu ekstraktu un mārrutku lapu ekstraktu –, kuri tika gatavoti ar Soksleta ekstrakcijas metodi ar etanolu, pēc tam vakuumā ietvaicēti līdz pilnīgai šķīdinātāja atdalīšanai. Katrs ekstrakts tika pievienots četrās dažādās koncentrācijās (0,25%; 0,5%; 1% un 1,5%).

Eļļas paraugi tika uzglabāti 3 dažādos apstākļos:

- paaugstinātā temperatūrā ( $60 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) tumsā, termostatā Memmert (Vācija)
- $22 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  režīmā gaisma/tumsa;
- $22 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  tumsā.



**4. att. Pētījuma ceturrtā posma struktūra /**  
**Fig. 4. Structure of the fourth stage of experiment**

**Pētījumā noteiktie rādītāji un izmantotās metodes**

Mārrutku un lupstāju, to ekstraktu un eļļas paraugu analīzēm izmantotās metodes apkopotas 1. tabulā.

**1. tabula / Table 1**

**Mārrutku, lupstāju un eļļas paraugu analīzēm izmantotie standarti un metodes /**  
**The standards and methods used for analyses of horseradish, lovage and oil**

Nr.p.k. / No	Rādītāji / Indices	Standarti, metodes / Standards, methods
<u>Augi / Plants</u>		
1.	Mitruma saturs / <i>Moisture content</i>	LVS 272:2000; EBC 4.2.
2.	C vitamīns / <i>Vitamin C</i>	Jodometriskā metode / <i>Iodometric method</i> , T-138-15-01:2002
3.	Gaistošie savienojumi / <i>Volatile compounds</i>	Gāzes hromatogrāfijas metode, GH / <i>Gas chromatography method, GC</i>
<u>Ekstrakti / Extracts</u>		
4.	Kopējais fenolu saturs / <i>Total phenol content</i>	Singleton et al., 1999
5.	Kopējais flavonoīdu saturs / <i>Total flavonoid content</i>	Kim et al., 2003
6.	Atsevišķie fenoli / <i>Individual phenols</i>	Šķidrums hromatogrāfijas metode, AEŠH / <i>Liquid chromatography</i> <i>method, HPLC</i> Özkan, Gokturk Baydar, 2006
7.	Antiradikālā aktivitāte / <i>Scavenging activity:</i> • DPPH <sup>•</sup> • ABTS <sup>•+</sup>	Yu et al., 2003 Re et al., 1999

Nr.p.k. / No	Rādītāji / Indices	Standarti, metodes / Standards, methods
8.	Reducēšanas spēja / <i>Reducing power</i>	Athukorala et al., 2006
<u>Eļļas paraugi / <i>Oil samples</i></u>		
9.	Peroksīdu skaitlis / <i>Peroxide value</i>	LVS EN ISO 3960: 2010
10.	Skābes skaitlis / <i>Acid value</i>	LVS EN ISO 660:2009
11.	Eļļas antiradikālā aktivitāte / <i>Scavenging activity of oil</i>	Ha et al., 2012
12.	Krāsa / <i>Colour</i>	CIE L*a*b*

### Datu matemātiskā apstrāde un interpretācija

Datu matemātiskā apstrāde veikta ar matemātiskās statistikas metodēm. Aprēķini veikti ar „MS Excel” programmu, „SPSS 17.0” statistikas programmu. Visiem iegūtajiem rezultātiem aprēķināti šādi rādītāji: vidējais aritmētiskais, standartnovirze.

Izvirzītās hipotēzes pārbaudītas ar p-vērtības metodi, un faktori novērtēti kā būtiski, ja p-vērtība <  $\alpha_{0,05}$ . Pētījumā izmantotas šādas testēšanas metodes: divfaktoru dispersijas analīze (ANOVA), korelācijas un regresijas analīze un datu savstarpējā būtiskuma noteikšanai Tjūkija tests, kā arī hierarhijas klasteru metode.

\* Grafikos un tabulās visas vērtības, kas atzīmētas ar vienu un to pašu burtu, nav būtiski atšķirīgas savā starpā, ja  $p < 0,05$ .

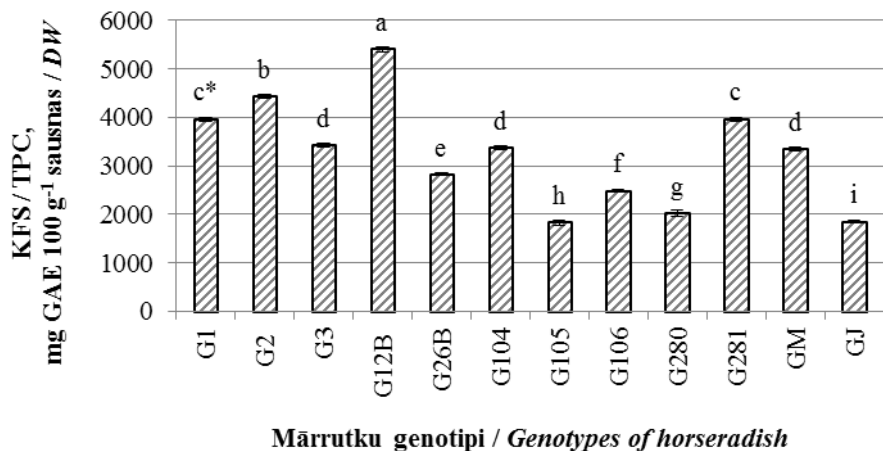
## PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

### 1. Nozīmīgāko bioloģiski aktīvo savienojumu un to antioksidatīvās aktivitātes izvērtējums mārrotkos un lupstajos

Pētījumā veikts nozīmīgāko bioloģiski aktīvo savienojumu izvērtējums svaigās 12 mārrotku genotipu saknēs un lapās un 4 lupstāju genotipu saknēs, kātos un lapās. Eksperimentāli pierādīts, ka mārrotku un lupstāju bioloģiski aktīvo vielu sastāvs būtiski atšķiras dažādās auga daļās, un to ietekmē genotips, kā arī novākšanas laiks.

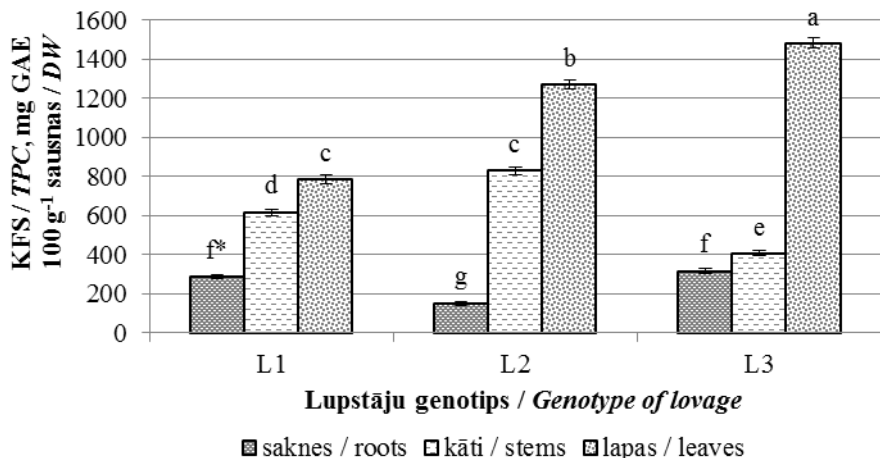
**Fenolu savienojumi.** Visos analizētajos augu materiālos kopējo fenolu saturs (KFS) bija robežās no  $94,69 \pm 2,89$  mg GAE 100 g-1 sausas līdz  $5406,21 \pm 28,00$  mg GAE 100 g-1 sausas, visaugstākais – mārrotku genotipa G12B lapās (5. att.).

Mārrotku lapās fenolu saturs bija visaugstākais starp analizētajiem paraugiem, bet saknēs tas bija līdz pat 25 reizēm mazāks. Arī lupstājiem bija vērojama līdzīga iezīme, un fenolu savienojumu saturs lupstāju lapās bija vidēji 2 reizes lielāks nekā kātos un 5 reizes lielāks nekā saknēs (6. att.).



**5.att. Kopējais fenolu saturs dažāda genotipa mārrutku lapās /**  
**Fig. 5. Total phenolic content of horseradish leaves dependent on the genotype**

Izmantojot hierarhisko klasteru analīzi mārrutku sakņu paraugus iedalot klasteros pēc KFS, vērojama homogēna grupa, izņemot genotipus G280 un G281, kuri uzrādīja augstākos rezultātus.



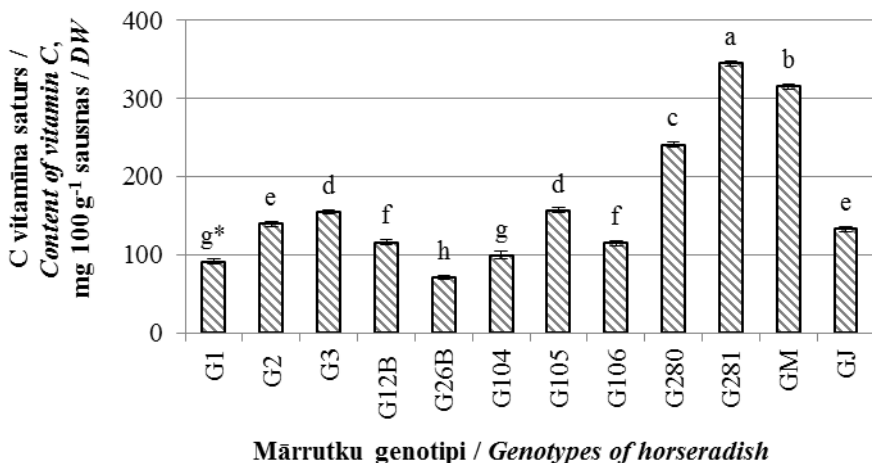
**6. att. Kopējais fenolu saturs svaigos lupstājos /**  
**Fig. 6. Total phenolic content of fresh lovage**

Šādas iezīmes vērojamas arī kopējā fenolu satura (KFIS) rādītājiem. Eksperimentāli pierādīts, ka starp visiem analizētajiem augu materiāliem mārrutku

genotipa G12B lapās ir vislielākais KFIS ( $15510,20 \pm 37,09$  mg CE  $100 \text{ g}^{-1}$  sausas), bet vismazākais – mārrutku genotipa G105 saknēs ( $105,70 \pm 8,29$  mg CE  $100 \text{ g}^{-1}$  sausas).

No analizētajiem paraugiem eksperimentos tika noteikts: no identificētajiem atsevišķajiem fenolu savienojumiem vislielākais daudzums tika konstatēts lupstāju genotipa L3 kātos – kafijskābe bija  $95,03 \pm 0,18$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  sausas, hlorogēnskābe –  $85,91 \pm 0,16$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  sausas un rufīns  $67,72 \pm 0,11$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  sausas.

**C vitamīns.** Eksperimentos noteiktais C vitamīna saturs mārrutku saknēs bija ievērojami lielāks nekā lupstāju paraugos. Arī dažādu mārrutku genotipu saknēs tas būtiski svārstījās no  $71,10$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  sausas ( $23,97 \pm 0,89$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  svaiga produkta) līdz  $344,93$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  sausas ( $97,63 \pm 0,94$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  svaiga produkta) attiecīgi mārrutku genotipu G26B un GM saknēs (7. att.).



7. att. C vitamīna saturs svaigās dažāda genotipa mārrutku saknēs /  
**Fig. 7. Content of vitamin C in fresh horseradish roots depending on the genotype**

Savukārt lupstāju saknēs C vitamīna saturs bija ievērojami zemāks nekā mārrutku saknēs un svārstījās robežās no  $12,46$  (L1) līdz  $21,84$  (L3) mg  $100 \text{ g}^{-1}$  svaiga produkta vai no  $18,98$  (L1) līdz  $40,32$  (L3) mg  $100 \text{ g}^{-1}$  sausas.

**Gaistošie savienojumi.** Galvenais gaistošais savienojums visos mārrutku sakņu paraugos bija alilizotiocianāti (AITC), kas veidoja 64–82% kopējo identificēto gaistošo savienojumu (2. tab.), un visvairāk tas tika konstatēts genotipa G1, bet vismazāk – G106 saknēs.

Šis sadalījums klasteros atšķiras no dalījuma klasteros pēc fenolu savienojumu satura. Tas skaidrojams ar to, ka gaistošie organiskie savienojumi un fenola savienojumi veidojas dažādu biosintēzes procesu rezultātā (Velišek, Cejpek, 2008).



Mārrutku sakņu sadalījums klāsteros pēc galveno gaistošo savienojumu satura /  
*Division of horseradish roots in clusters based on content of volatiles,*  
 (smailu laukums, % kopējā laukuma / *peak area % of the total area*)

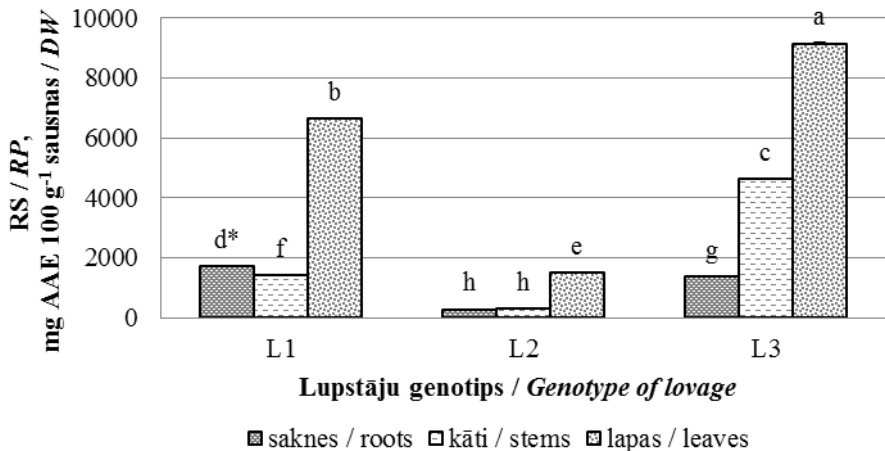
Klasteri / <i>Cluster</i>	Genotips / <i>Genotype</i>	2-BuITC	AITC	3-metilBuITC	CPITC
1	G2, G104, G105, G281	0.81–1.92	68.99–74.46	11.11–12.62	0.37–2.82
2	G12B, G280	1.82–2.81	75.61–79.10	12.74–14.58	0.26–2.10
3	G1	2.00	81.82	5.14	3.20
4	G3	1.18	71.34	2.64	4.36
5	G106	2.15	63.60	6.38	0.69

BuITC – butilizotiocianāts / *butylisothiocyanate*;

AITC – alilizotiocianāti / *allylisothiocyanate*;

CPITC – ciklopentilizotiocianāts / *cyclopentylisothiocyanate*.

**Antioksidantu aktivitāte (AA).** Lielākā AA eksperimentos tika konstatēta lupstāju genotipa L4 kātos. Antiradikālā aktivitāte (ArA) bija  $178,55 \pm 3,37$  mM TE  $100 \text{ g}^{-1}$  sausnas, analizējot pēc DPPH<sup>·</sup> metodes, reducēšanas spēja (RS) –  $45595,71 \pm 99,31$  mg AAE  $100 \text{ g}^{-1}$  sausnas. Savukārt vizzemākā antiradikālā aktivitāte bija mārrutku genotipa GM saknēs ( $2,30 \pm 0,04$  mM TE  $100 \text{ g}^{-1}$  sausnas) ar DPPH<sup>·</sup> metodi, bet mazākā reducēšanas spēja (RS) tika konstatēta lupstāju genotipa L2 saknēs ( $266,46 \pm 20,06$  mg AAE  $100 \text{ g}^{-1}$  sausnas) (8. att.).



8. att. Reducēšanas spēja dažādās lupstāju auga daļās /  
 Fig. 8. The reducing power of lovage depending on the parts of the plant

Lupstāju genotipam L2 iezīmējās tendence, ka gan saknēs, gan kātos, gan arī lapās ir mazākā reducēšanas spēja.

Vairāki autori ir pārliecinājušies, ka augu ķīmiskais sastāvs ir atkarīgs no auga ražas novākšanas laika (Koh et al., 2009), attīstības posma (Björkman et al., 2011) un augšanas apstākļiem (Podsędek, 2007; Kusznierevicz et al., 2008). Pētījumā iegūtie rezultāti rāda, ka augstāko rādītāju iegūšanai katrs analizētais augu materiāls ir novācams dažādos novākšanas laikos (3. tab.).

3. tabula / Table 3

**Mārrutku un lupstāju novākšanas laiks augstāko rādītāju iegūšanai /  
Horseradish and lovage appropriate harvest time to obtain the maximum  
performance (2011. gads / year)**

Parametri / Parameters	Mārrutki / <i>Horseradish</i>		Lupstāji / <i>Lovage</i>	
	Saknes / <i>Roots</i>	Lapas / <i>Leaves</i>	Kāti / <i>Stems</i>	Lapas / <i>Leaves</i>
KFS / <i>TPC</i>	Septembrī / <i>September</i>	Jūnijā / <i>June</i>	Augustā / <i>August</i>	Jūnijā / <i>June</i>
KFIS / <i>TFC</i>	n.a.	Jūnijā / <i>June</i>	Jūnijā / <i>June</i>	Jūnijā / <i>June</i>
ArA / <i>SA</i>	Augustā / <i>August</i>	Jūnijā / <i>June</i>	Augustā / <i>August</i>	Augustā / <i>August</i>
RS / <i>RP</i>	n.a.	Septembrī / <i>September</i>	Augustā / <i>August</i>	Jūlijā / <i>July</i>

n.a. – nav analizēts / *not analysed*

Hierarhiskā klasteru analīze tika izmantota, lai sagrupētu datu kopumu no 5 mainīgajiem (KFS, KFIS un ArA, un RS) un 36 augu materiāliem, un rezultātā mārrutku lapu un sakņu un lupstāju sakņu, kātu un lapu paraugi tika iedalīti 8 klasteros, atsevišķos klasteros apvienojot mārrutku genotipu G2 un G12B lapas ar lielāko KFS, KFIS un ArA.

## 2. Bioloģiski aktīvo savienojumu satura un antioksidantu aktivitātes izmaiņas mārrutkos un lupstājos tehnoloģisko procesu ietekmē

Garšaugus un dārzeņus nav iespējams ilgstoši saglabāt svaigus, un, lai varētu tos izmantot neatkarīgi no sezonālātes, tiek izmantota saldēšana vai kaltēšana. Literatūras dati liecina, ka kaltēšana un saldēšana ietekmē bioloģiski aktīvo savienojumu saturu un AA augos (Pinelo et al., 2004; Chan et al., 2009; Siriamornpun et al., 2012; Chan et al., 2013). Izplatītāki ir tradicionālie jeb konvencionālie apstrādes veidi, kurus iespējams realizēt ikvienam arī nelielā ražošanā. Kā viens no šādiem apstrādes veidiem tika izvēlēta saldēšana, sasaldējot augu materiālus -40 °C temperatūrā un tad uzglabājot -18 °C, kā otrs – kaltēšana tumsā istabas temperatūrā bez papildu gaisa cirkulācijas līdz noteiktam produkta mitrumam. Promocijas darbā konvencionālo apstrādes veidu ietekme tika analizēta mārrutku genotipa GJ lapām un lupstāju genotipa L1 lapām un kātiem, kuriem veikts fenolu savienojumu satura un to AA izvērtējums.

Kā labākais lupstāju lapu un kātu un mārrutku lapu apstrādes veids to uzglabāšanai ir saldēšana, jo KFS un KFIS palielinās (4. tab.).

4. tabula / Table 4

KFS un KFIS mārutku lapās, lupstāju lapās un kātos atkarībā no apstrādes veida / TPC and TFC in horseradish leaves, lovage leaves and stems, depending on the type of treatment

Augu materiāls / Plant material	Apstrādes veids / Type of treatment	KFS / TPC, mg GAE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	KFIS / TFC, mg CE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	KFIS:KFS / TFC:TPC
Mārutku lapas / Horseradish leaves	Svaigs / Fresh	2368.48±2.03 <sup>b*</sup>	5889.85±6.02 <sup>b</sup>	0.63
	Saldēts / Frozen	2722.13±2.03 <sup>a</sup>	6178.03±6.27 <sup>a</sup>	0.83
	Kaltēts / Dried	123.60±0.17 <sup>h</sup>	287.79±0.28 <sup>h</sup>	0.17
Lupstāju lapas / Lovage leaves	Svaigs / Fresh	1593.61±1.09 <sup>d</sup>	2965.40±2.69 <sup>d</sup>	0.29
	Saldēts / Frozen	1601.87±1.47 <sup>c</sup>	3548.33±3.08 <sup>c</sup>	0.71
	Kaltēts / Dried	359.75±0.37 <sup>g</sup>	551.01±0.55 <sup>g</sup>	0.18
Lupstāju kāti / Lovage stems	Svaigs / Fresh	381.15±0.39 <sup>f</sup>	1208.18±1.83 <sup>f</sup>	0.50
	Saldēts / Frozen	458.03±0.40 <sup>e</sup>	1259.94±1.51 <sup>e</sup>	0.34
	Kaltēts / Dried	44.83±0.07 <sup>i</sup>	184.04±0.14 <sup>i</sup>	0.47

\* Dažādie burti vienā kolonnā apzīmē būtiski nozīmīgas atšķirības starp vērtībām (Tjūkija tests, p<0,05) / The different letters in the same column represents significant differences between values (Tukey's test, p<0.05).

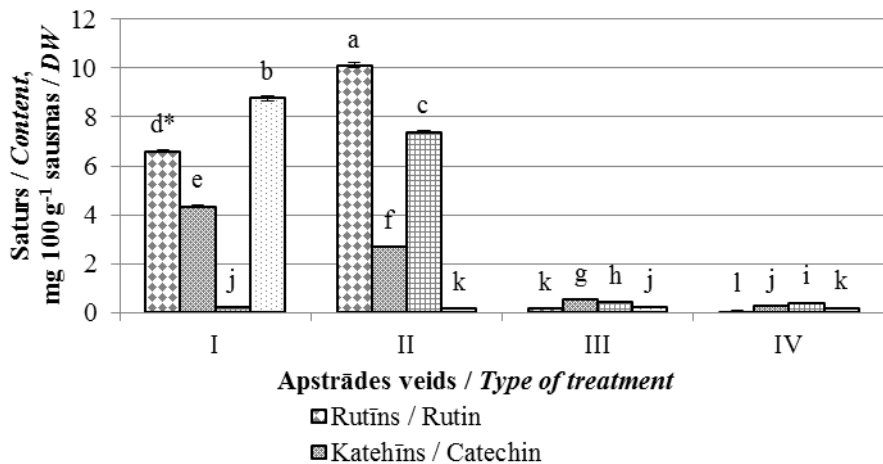
Kaltēšanas rezultātā visos pētītajos paraugos būtiski samazinājās fenolu savienojumu saturs, salīdzinot ar svaigiem, un lupstāju lapu paraugos KFS samazinājās 4,43 reizes, KFIS – 5,38 reizes, salīdzinot ar svaigām lupstāju lapām. Vislielākais flavonoīdu īpatsvars vērojams saldētās mārutku un lupstāju lapās, bet vismazākais – kaltētās mārutku un lupstāju lapās.

Arī AA saldētos lupstāju kātos un lapās bija augstāka, nekā svaigos. Saldēšanas ietekmē sadalās kompleksi savienojumi, kā rezultātā palielinās reducēšanas spēja un ABTS<sup>•+</sup> antiradikālā aktivitāte.

Konvencionālais kaltēšanas veids ir ilgstošs, tādēļ, lai to saīsinātu, tika meklētas mūsdienīgākas apstrādes metodes. Promocijas darbā tika izvēlēta mikroviļņu-vakuuma un sublimācijas kaltēšana, kā ietekme tika analizēta mārutku genotipa GJ sakņu paraugiem. Mikroviļņu-vakuuma kaltēšana ir efektīva metode ātrai produkta dehidratācijai, kas nenorit paaugstinātā temperatūrā, un tā ir izmantota dažādu augu izcelsmes produktu kaltēšanai. Arī variējot pievadītās mikroviļņu

enerģijas daudzumu, iespējams maksimāli saglabāt apstrādājamā produkta uzturvērtību (Dorofejeva et al., 2011; Kruma et al., 2011). Turpmāko pētījumu veikšanai izvēlēti saldēšanas un kaltēšanas parametri, balstoties uz citu zinātnieku pētījumiem, un izvērtēta to piemērotība mārrutku sakņu lietošanas iespēju pagarināšanai.

Mārrutku saknēs saldēšanas rezultātā palielinājās rutīna un kafijskābes saturs (9. att.), kā arī ABTS<sup>•+</sup> antiradikālā aktivitāte un reducēšanas spēja.



**9. att. Atsevišķo fenolu satura izmaiņas mārrutku saknēs apstrādes ietekmē / Fig. 9. Changes of content of individual phenols in horseradish roots affect by treatment**

I – svaigs / Fresh;

II – saldēts / Freeze;

III – kaltēts mikroviļņu-vakuuma kaltē / Microwave-vacuum dried;

IV – kaltēts sublimācijas kaltē / Freeze dried.

Gan tradicionālās kaltēšanas, gan arī sublimēšanas rezultātā samazinās fenolu savienojumu saturs un to antioksidatīvā aktivitāte, vienīgi pēc apstrādes mikroviļņu-vakuuma kaltē palielinās ABTS<sup>•+</sup> antiradikālā aktivitāte mārrutku saknēs, salīdzinot ar svaigām (5. tab.).

Apkopojot visus dažādi apstrādātu mārrutku un lupstāju analīžu rezultātus, tika izmantota hierarhiskā klasteru analīze, lai sagrupētu datu kopumu no 5 mainīgajiem (KFS, KFIS, ArA un RS) un 13 paraugiem.

AA dažādi apstrādātās mārrutku saknēs /  
*AA of the horseradish roots depending on the treatment*

Paraugi / Samples	DPPH <sup>•</sup> , mM TE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	ABTS <sup>•+</sup> , mM TE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	RS / RP, mg AAE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW
Svaigs / Fresh	53.57±1.17 <sup>a*</sup>	9.50±2.08 <sup>c</sup>	5272.92±13.16 <sup>b</sup>
Saldēts / Frozen	20.87±0.17 <sup>b</sup>	30.10±0.42 <sup>a</sup>	6825.37±19.59 <sup>a</sup>
Kaltēts mikroviļņu- vakuuma kaltē / <i>Microwave-vacuum dried</i>	7.44±0.11 <sup>d</sup>	13.05±0.29 <sup>b</sup>	2534.03±3.84 <sup>c</sup>
Kaltēts sublimācijas kaltē / <i>Freeze dried</i>	13.71±0.07 <sup>c</sup>	5.41±0.90 <sup>d</sup>	2261.58±10.15 <sup>d</sup>

\* Dažādie burti vienā kolonnā apzīmē būtiski nozīmīgas atšķirības starp vērtībām (Tjūkija tests,  $p < 0,05$ ) /  
*The different letters in the same column represents significant differences between values (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).*

Rezultātā atsevišķā klasterī apvienoti augu paraugi ar lielāko fenolu savienojumu saturu (svaigas un saldētas mārrutku lapas), bet citā klasterī apvienoti paraugi ar lielāko RS (svaigas un saldētas lupstāju lapas).

### 3. Ekstrakcijas apstākļu ietekmes izvērtējums uz bioloģiski aktīvo savienojumu saturu mārrutku un lupstāju ekstraktos

Analizējot sublimētus paraugus, rezultāti parādīja, ka bioloģiski aktīvo savienojumu saturu mārrutku un lupstāju ekstraktos būtiski ietekmē ekstrakcijas šķīdinātāja polaritāte, ekstrakcijas ilgums, ekstrakcijas temperatūra un spiediens, kā arī ekstrakcijas metode, ko analizēja, izmantojot sublimētus paraugus.

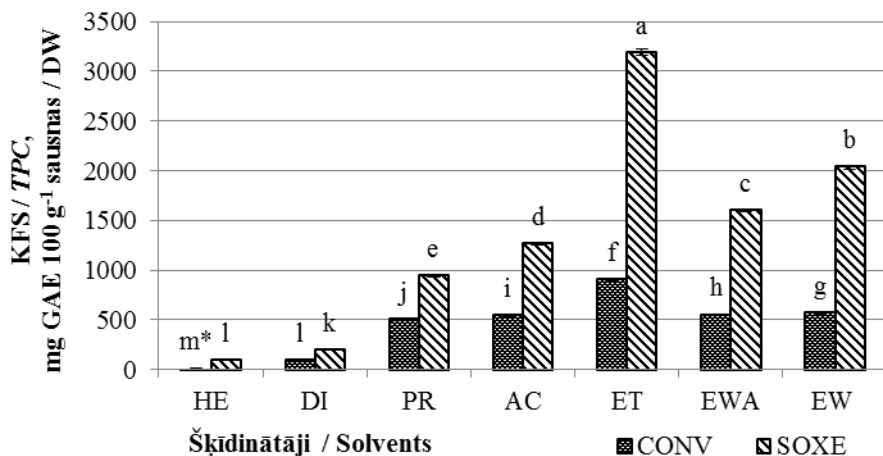
#### Ekstrakcijas šķīdinātāju ietekmes izvērtējums

Ekstrakcijas šķīdinātāju ietekmes izvērtējumam tika izvēlētas plaši izmantotas ekstrakcijas metodes: konvencionālā un Soksleta metode. Tās ir metodes, kurām viens no variējamiem ekstrakcijas parametriem ir izmantotais šķīdinātājs. Tika izmantoti septiņi šķīdinātāji ar atšķirīgu polaritāti. Konvencionālā ekstrakcija tika veikta apkārtējās vides temperatūrā, bet ekstrakcija Soksleta iekārtā – šķīdinātāja viršanas temperatūrā. Daudzfaktoru dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka gan izmantotais šķīdinātājs, gan ekstrakcijas metode ir nozīmīgi faktori, kas ietekmē fenolu savienojumu saturu un AA ( $p < 0,05$ ).

Šķīdinātāja polaritātei ir liela nozīme, lai palielinātu fenolu savienojumu šķīdību (Naczka, Shahidi, 2006). Iegūtie rezultāti parādīja, ka visos pētītajos augu materiālos fenolu saturs pieauga, palielinoties šķīdinātāju polaritātei.

Mārrutku lapu ekstraktos KFS palielinājās vidēji 42 reizes (10. att.), bet lupstāju lapu ekstraktos (11. att.), izmantojot Soksleta metodes ekstrakciju, bija vislielākās

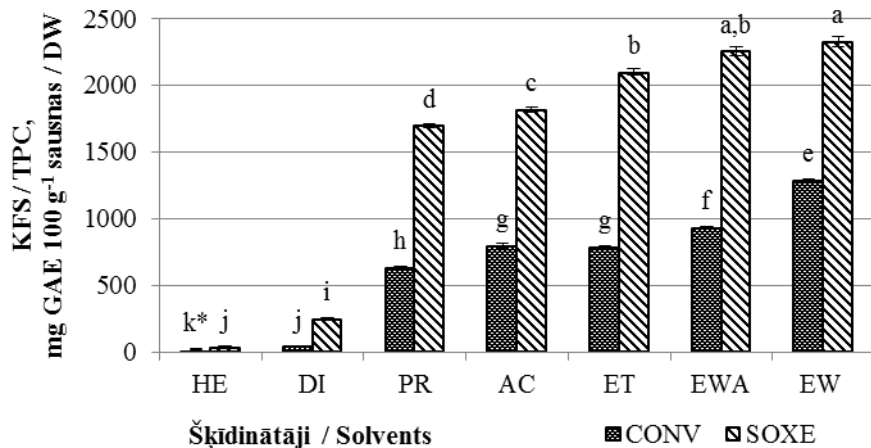
KFS svārstības no  $39,31 \pm 1,65$  mg GAE  $100\text{ g}^{-1}$  sausas (ar HE) līdz  $2327,68 \pm 4,03$  mg GAE  $100\text{ g}^{-1}$  sausas.



10. att. Fenolu saturs mārrutku lapu ekstraktos atkarībā no šķīdinātāja /  
 Fig. 10. Total phenolic content in horseradish leaves extracts depending on solvent

HE – n-heksāns / *n-hexane*; DI – dietilēteris / *diethylether*; PR – 2-propanols / *2-propanol*;  
 AC – acetons / *acetone*; ET – etanols / *ethanol*; EWA – etanols/ūdens/etiķskābe / *ethanol/water/acetic acid* (80/20/1 v/v/v); EW – etanols/ūdens / *ethanol/water* (80/20 v/v).

Savukārt, palielinoties šķīdinātāju polaritātei, KFIS pieauga vidēji trīs reizes.



11. att. Fenolu saturs lupstāju lapu ekstraktos atkarībā no šķīdinātāja /  
 Fig. 11. Total phenolic content in lovage leaves depending on solvent

Arī AA būtiski ietekmēja izmantotā šķīdinātāja polaritāte, kā arī izvēlēta ekstrakcijas metode, un šī tendence bija izteiktāka Soksleta metodes ekstrakcijai. Palielinoties šķīdinātāja polaritātei, antiradikālā aktivitāte palielinājās vidēji četras reizes, bet reducēšanas spēja palielinājās vidēji sešas reizes.

Apkopojot visus rezultātus, labākie ekstrakti tika iegūti, izmantojot Soksleta ekstrakcijas metodi ar izteikti polāriem šķīdinātājiem (6. tab.).

6. tabula / Table 6

**Piemērotākie šķīdinātāji mārūtkiem un lupstājiem, lai iegūtu ekstraktus ar augstāku fenolu saturu un AA / Suitable solvents for horseradish and lovage to obtain extracts with higher phenol content and AA**

Analizētie parametri / Analyzed parameters	Lielākie iegūtie rezultāti / Major results	Ekstrakta augu materiāls / Extract of the plant material	Ekstrakcijas šķīdinātājs / Extraction solvent	Ekstrakcijas metode / Extraction method
KFS / TPC	3192.96 mg GAE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Mārūtķu lapas / Horseradish leaves	ET	SOXE
KFIS / TFC	8929.22 mg CE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Mārūtķu lapas / Horseradish leaves	ET	SOXE
DPPH <sup>·</sup>	168.76 mM TE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Lupstāju lapas / Lovage leaves	EWA	SOXE
ABTS <sup>·+</sup>	623.42 mM TE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Lupstāju kāti / Lovage leaves	EW	SOXE
RS / RP	9616.67 mg AAE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Mārūtķu lapas / Horseradish leaves	ET	SOXE

ET – etanols / ethanol; EWA – etanols/ūdens/etiķskābe / ethanol/water/acetic acid (80/20/1 v/v/v);  
EW – etanols/ūdens / ethanol/water (80/20 v/v).

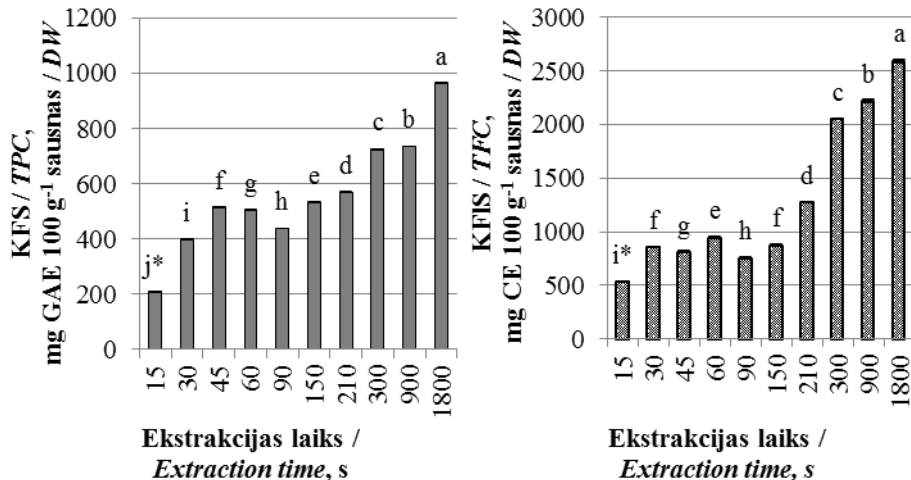
SOXE – Soksleta ekstrakcija / Soxhlet extraction

**Mikroviļņu un ultraskaņas ietekmes izvērtējums**

Ultraskaņas viļņu un mikroviļņu ietekmes izvērtējumam tika izvēlētas ultraskaņas (UAE) un mikroviļņu (MAE) veicinātas ekstrakcijas metodes. Tās ir ekstrakcijas, kurām viens no variējamiem parametriem ir ekstrakcijas ilgums. Ekstrakcijas šķīdinātāja ietekmes izvērtējuma rezultāti parādīja, ka etanols ir viens no labākajiem šķīdinātājiem, līdz ar to UAE un MAE tika izmantots etanols. UAE laikā skaņas viļņi ar mehānisku vibrāciju iedarbojas uz cietām vielām un šķīdumiem, kā rezultātā var paplašināties cietas vielas šūnu sienīņu poras, kas uzlabo difūzijas procesu un palielina masas pārvietošanu (Angela, Meireles, 2009). Savukārt MAE laikā mikroviļņu ietekmē tiek pārrauti cietās vielas šūnapvalki, kā rezultātā tiek atbrīvoti fitosavienojumi (Wu et al., 2012). Šo ekstrakcijas veidu ietekmē arī paaugstināta temperatūra (50–77 °C).

Daudzfaktoru dispersijas analīzes rezultāti rādīja, ka gan ekstrakcijas ilgums, gan arī ekstrakcijas metode ir būtiski faktori, kas ietekmē KFS, KFIS, kā arī to AA ( $p < 0,05$ ).

Analizējot atsevišķus parametrus, abām metodēm nebija vērojamas vienādas tendences, turklāt katram pētītajam augu materiālam bija atšķirīgas iezīmes. Izmantojot UAE, bija vērojama iezīme, ka, pagarinoties ekstrakcijas ilgumam, pieaug arī fenolu saturs un antioksidantu aktivitāte (12. att.).

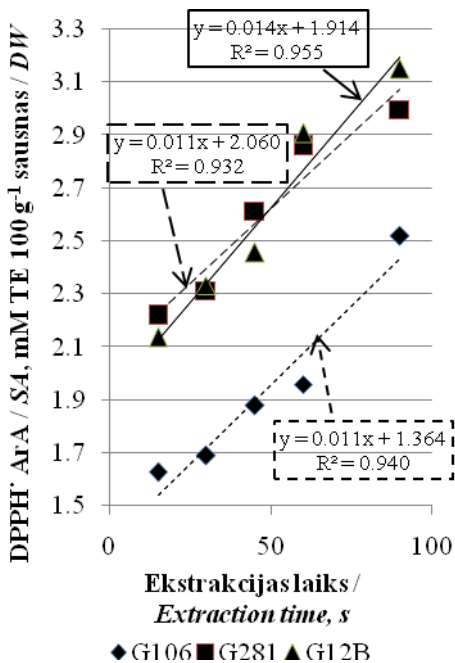
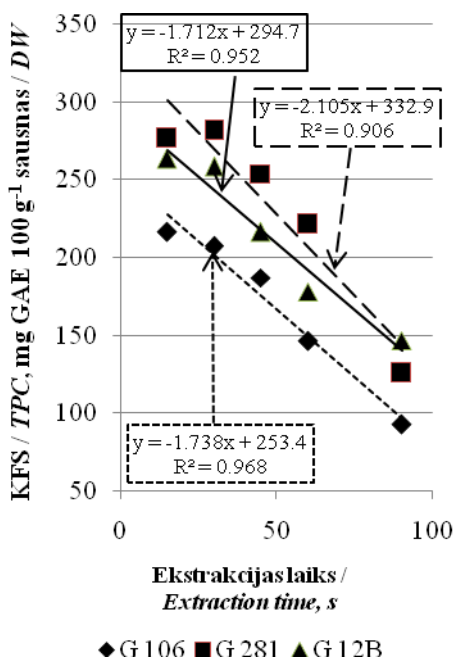


12. att. UAE ilguma ietekme uz KFS un KFIS mērrutku lapu ekstraktos /  
*Fig. 12. UAE extraction time effect on the TPC and TFC of  
 horseradish leaves extract*

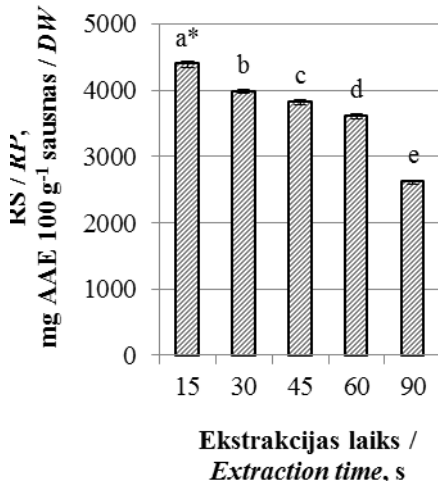
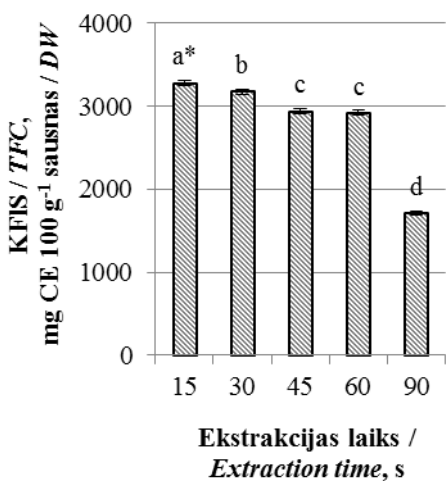
UAE lupstāju lapu ekstraktiem bija vērojama sakarība starp KFIS un ABTS katjonu saistīšanas spēju ( $r = 0,88$ ), kas ļauj prognozēt, ka lupstāju lapās esošie flavonoīdi darbojas kā radikāļu ( $ABTS^{\cdot+}$ ) saistītāji.

Arī mērrutku lapu ekstraktiem bija vērojama sakarība starp KFS un KFIS, kur, salīdzinot ekstraktus ar izmantoto 15 s un 1800 s ilgumu, KFS palielinājās 4,63 reizes, KFIS 4,89 reizes, bet ar AA šiem palielinājumiem nebija vērojamas nekādas sakarības. Savukārt MAE rezultātos bija vērojamas izteiktas tendences, kas pētītajiem mērrutku un lupstāju ekstraktiem atšķirās. Mērrutku sakņu ekstraktiem, pagarinoties ekstrakcijas ilgumam, fenolu saturs samazinājās, bet ArA palielinājās. Īpaši izcēlās mērrutku genotipu G106 un G12B sakņu ekstrakti, kuros, pagarinoties ekstrakcijas ilgumam, KFS samazinājās attiecīgi 2,33 un 1,8 reizes (13. att.) un DPPH<sup>·</sup> radikāļu saistīšanas aktivitāte palielinājās attiecīgi 1,55 un 1,47 reizes (13. att.). Savukārt pārējie analizēto augu materiālu ekstrakti uzrādīja nedaudz atšķirīgu iezīmi, un, pagarinoties ekstrakcijas ilgumam, visi parametri samazinājās (14. att.).





13. att. MAE ilguma ietekme uz KFS un ArA mērrutku sakņu ekstraktos / Fig. 13. Effect of MAE extraction time on the TPC and SA of horseradish roots



14. att. MAE ilguma ietekme uz KFIS un AA mērrutku lapu ekstraktos / Fig. 14. MAE extraction time effect on the content of phenolic compounds and AA of horseradish leaves

Salīdzinot ultraskaņas un mikroviļņu veicinātajās ekstrakcijās iegūtos ekstraktus (7. tab.), vēlreiz var pārliecināties, ka nav iespējams noteikt universālu ekstrakcijas metodi un ilgumu visiem augu materiāliem.

7. tabula / Table 7

**Mārrutkiem un lupstājiem piemērotākais UAE un MAE ekstrakcijas metodes ilgums mārrutku un lupstāju ekstraktu ar augstāku fenolu saturu un AA iegūšanai / Suitable time of UAE and MAE for horseradish and lovage to obtain extracts with higher phenol content and AA**

Analizētie parametri / Analyzed parameters	Lielākie iegūtie rezultāti / Major results	Ekstrakta augu materiāls / Extract of the plant material	Ekstrakcijas metode / Extraction method	Ekstrakcijas ilgums / Extraction time
KFS / TPC	2053,16 mg GAE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Lupstāju kāti / Lovage stems	UAE	60 s
KFIS / TFC	3277,71 mg CE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Mārrutku lapas / Horseradish leaves	MAE	15 s
DPPH <sup>•</sup>	82,24 mM TE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Lupstāju lapas / Lovage leaves	UAE	15 s
ABTS <sup>•+</sup>	33,66 mM TE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Lupstāju lapas / Lovage leaves	MAE	15 s
RS / RP	4392,31 mg AAE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	Mārrutku lapas / Horseradish leaves	MAE	15 s

**Ekstrakcijas temperatūras un spiediena ietekmes izvērtējums**

Fenolu savienojumu satura un AA izmaiņām lupstāju lapu un kātu un mārrutku sakņu ekstraktos temperatūras un spiediena ietekmē tika izmantotas vairākas ekstrakcijas metodes – konvencionālā (CONV), Soksleta (SOXE), zemkritiskā stāvokļa (SUB), kā arī paātrinātā (ASE) ekstrakcija, kā šķīdinātāju izmantojot etanolu. Konkrēti ekstrakcijas apstākļi ir aprakstīti 8. tabulā.

8. tabula / Table 8

**Ekstrakcijas apstākļi / Extraction conditions**

Ekstrakcijas metode / Extraction method	Temperatūra / Temperature, °C	Spiediens / Pressure, Pa
CONV	22±2	1×10 <sup>5</sup>
SOXE	78±2	1×10 <sup>5</sup>
SUB	80	1.1×10 <sup>7</sup>
ASE	110	1.1×10 <sup>7</sup>

Līdz šim nav pieejami ziņojumi par zemkritiskā stāvokļa un paātrinātā ekstrakciju izmantošanu antioksidantu ekstrakcijai no mārrutkiem un lupstājiem.

Daudzfaktoru dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka gan augu materiāls, gan arī ekstrakcijas metode ir būtiski faktori, kas ietekmē KFS, KFIS, kā arī to AA ( $p < 0,05$ ).

Pētījumi parādīja, ka lupstajos esošie flavonoīdi ir līdzīgi saistīti augu šūnās un tiem piemīt arī līdzīga termostabilitāte, bet mārrutku saknēs esošie flavonoīdi ir visai termostabili un no saviem saistītajiem savienojumiem atdalās tikai temperatūras un spiediena ietekmē (9. tab.). Arī flavonoīdu saturam ir tendence palielināties augstākās temperatūrās, un lupstāju kātu SOXE ekstraktos KFIS ir pat 6 reizes lielāks, salīdzinot ar CONV ekstraktiem. Savukārt, ja ir paaugstināts spiediens, visiem pētītajiem augu materiāliem nav būtiskas atšķirības, vai ekstrakcija notiek zem šķīdinātāja kritiskā punkta vai virs tā. Tajā pašā laikā vienādā temperatūrā, palielinot spiedienu, ir vērojams KFIS samazinājums, ko varētu skaidrot ar flavonoīdu degradēšanos spiediena ietekmē līdzīgi kā KFS gadījumā. Neatkarīgi no ekstrakcijas metodes vislielākais KFS un KFIS tika konstatēts lupstāju lapās, bet vismazākais mārrutku saknēs.

9. tabula / Table 9

**Fenolu savienojumu satura atšķirības dažādos temperatūras un spiediena režīmos iegūtos mārrutku un lupstāju ekstraktos /**  
**Variations in content of phenolic compounds horseradish and lovage extracts**  
**obtained at different temperature and pressure regimes**

Augu materiāli / Plant material	Ekstrakcijas metode / Extraction method	KFS / TPC, mg GAE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	KFIS / TFC, mg CE 100 g <sup>-1</sup> sausnas / DW	KFIS:KFS / TFC:TPC
Mārrutku saknes / Horseradish root	CONV	90.91±3.06 <sup>a,b*</sup>	252.57±14.00 <sup>a,b</sup>	0.44
	SOXE	185.31±3.43 <sup>b,c</sup>	170.28±12.04 <sup>a,b</sup>	0.11
	SUB	232.97±17.02 <sup>c</sup>	299.68±14.46 <sup>b</sup>	0.15
	ASE	397.14±31.89 <sup>d</sup>	438.80±17.08 <sup>c</sup>	0.13
Lupstāju kāti / Lovage stem	CONV	618.06±30.76 <sup>e</sup>	816.93±12.31 <sup>e</sup>	0.15
	SOXE	716.15±30.25 <sup>e,f</sup>	5521.79±64.37 <sup>j</sup>	0.49
	SUB	632.95±11.63 <sup>e</sup>	526.00±12.58 <sup>c,d</sup>	0.26
	ASE	651.18±18.87 <sup>e</sup>	534.81±11.79 <sup>c,d</sup>	0.09
Lupstāju lapas / Lovage leaves	CONV	784.30±14.38 <sup>f</sup>	2591.12±70.36 <sup>h</sup>	0.38
	SOXE	2099.74±60.89 <sup>h</sup>	8577.94±107.71 <sup>k</sup>	0.47
	SUB	3221.42±99.18 <sup>i</sup>	4247.01±54.99 <sup>i</sup>	0.15
	ASE	1605.67±25.60 <sup>g</sup>	4268.81±43.07 <sup>i</sup>	0.31

CONV – konvencionālā ekstrakcija /conventional extraction, SOXE – Soksleta ekstrakcija / Soxhlet extraction, SUB – zemkritiskā ekstrakcija / subcritical extraction, ASE – paātrinātā ekstrakcija / accelerated solvent extraction.

Salīdzinot ekstraktu AA, bija vērojamas līdzīgas iezīmes, ka labāki rezultāti iegūti, izmantojot ekstrakcijas paaugstinātā temperatūrā (paaugstinātas temperatūras

ietekmē tiek sašķelti kompleksi savienojumi ar vājām antioksidantu spējām, bet rezultātā atbrīvojas savienojumi ar izteiktu antiradikālu aktivitāti), bet sliktāki – ar konvencionālo ekstrakcijas metodi (10. tab.).

10. tabula / Table 10

**AA atšķirības dažādos temperatūras un spiediena režīmos iegūtos mērrutku un lupstāju ekstraktos / Variations in AA in different horseradish and lovage extracts obtained at temperature and pressure regimes**

Augu materiāli / Plant material	Ekstrakcijas metode / Extraction method	DPPH <sup>•</sup> , mM TE 100 g <sup>-1</sup> , sausnas / DW	ABTS <sup>•+</sup> , mM TE 100 g <sup>-1</sup> , sausnas / DW	RS / RP, mg AAE 100 g <sup>-1</sup> , sausnas / DW
Mērrutku saknes / Horseradish roots	CONV	5.49±0.21 <sup>a*</sup>	4.40±0.11 <sup>a,b</sup>	1967.13±110.06 <sup>e,f</sup>
	SOXE	12.05±0.37 <sup>a,b,c,d</sup>	25.78±1.69 <sup>d,e</sup>	6675.64±125.19 <sup>g</sup>
	SUB	11.23±1.55 <sup>a,b,c</sup>	6.52±0.90 <sup>a,b</sup>	846.77±37.38 <sup>a</sup>
	ASE	14.53±0.84 <sup>b,c,d,e</sup>	9.57±2.96 <sup>a,b,c</sup>	950.77±57.87 <sup>a,b</sup>
Lupstāju kāti / Lovage stems	CONV	16.77±0.67 <sup>b,c,d,e</sup>	40.52±0.61 <sup>f</sup>	1394.24±91.32 <sup>d</sup>
	SOXE	93.96±4.38 <sup>h</sup>	145.64±4.84 <sup>h</sup>	9600.46±189.48 <sup>h</sup>
	SUB	20.38±6.99 <sup>e,f</sup>	13.23±3.63 <sup>b,c</sup>	1039.86±106.28 <sup>a,b,c</sup>
	ASE	21.72±0.68 <sup>e,f</sup>	17.97±1.41 <sup>c,d</sup>	1315.75±78.55 <sup>c,d</sup>
Lupstāju lapas / Lovage leaves	CONV	19.78 ±0.96 <sup>d,e,f</sup>	74.46±2.64 <sup>g</sup>	6643.20±151.12 <sup>g</sup>
	SOXE	137.05±2.81 <sup>i</sup>	406.94±9.01 <sup>j</sup>	1219.99±95.44 <sup>b,c,d</sup>
	SUB	148.72±3.24 <sup>j</sup>	159.60±3.24 <sup>i</sup>	9971.14±133.24 <sup>i</sup>
	ASE	83.76±3.86 <sup>g</sup>	151.63±3.41 <sup>h,i</sup>	9492.01±128.57 <sup>h</sup>

CONV – konvencionālā ekstrakcija /conventional extraction, SOXE – Soksleta ekstrakcija / Soxhlet extraction, SUB – zemkritiskā ekstrakcija / subcritical extraction, ASE – paātrinātā ekstrakcija / accelerated solvent extraction.

Lupstāju kātu ekstraktiem bija vērojama iezīme, ka visiem analizētajiem parametriem visefektīvākā bija SOXE metode, arī mērrutku sakņu un lupstāju lapu ekstraktiem šī ekstrakcijas metode bija viena no efektīvākajām. Līdz ar to SOXE var izcelt kā efektīvu ekstrakcijas metodi fenolu savienojumu un dabīgo antioksidantu ekstrakcijai no mērrutku saknēm un lupstāju lapām un kātiem.

Rezultāti apliecina, ka šķīdinātājs vislielāko efektivitāti fenolu savienojumu iegūšanai uzrāda, sasniedzot savas kritiskās temperatūras robežu, bet, uzkarstot virs kritiskās robežas, tā efektivitāte samazinās (11. tab.), jo notiek fenolu savienojumu termiskā degradācija, kā rezultātā tiek iegūti sadalīšanās produkti ar zemu molekulārmasu (Schieber et al., 2001; Ignat et al., 2010).

Neatkarīgi no ekstrakcijas metodes visaugstākie rezultāti tika konstatēti lupstāju lapu ekstraktos, bet vismazākie mērrutku sakņu ekstraktos.

Balstoties uz šī pētījuma rezultātiem, nav iespējams ieteikt vislabāko ekstrakcijas paņēmieni, kas derētu visiem augu materiāliem. To iespējams izskaidrot ar to, ka visi pētītie augu materiāli pēc savas bioloģiskās uzbūves ir atšķirīgi un fenolu savienojumi tajos tiek sintezēti atkarībā no attiecīgo fermentu klātbūtnes vai arī saistīti dažādos veidos.

**Piemērotākās metodes, lai iegūtu mārrotku un lupstāju etanola ekstraktus ar augstāku fenolu saturu un AA / Suitable methods to obtain ethanol extracts of horseradish and lovage with higher phenol content and AA**

<b>Analizētais parametrs / Analyzed parameters</b>	<b>Lielākie iegūtie rezultāti / Major results</b>	<b>Ekstrakta augu materiāls / Extract of the plant material</b>	<b>Ekstrakcijas metode / Extraction method</b>
KFS / TPC	3221.42 mg GAE 100 g <sup>-1</sup> sausas / DW	Lupstāju lapas / Lovage leaves	SUB
KFIS / TFC	8577.94 mg CE 100 g <sup>-1</sup> sausas / DW	Lupstāju lapas / Lovage leaves	SOXE
DPPH <sup>·</sup>	148.72 mM TE 100 g <sup>-1</sup> sausas / DW	Lupstāju lapas / Lovage leaves	SUB
ABTS <sup>·+</sup>	406.94 mM TE 100 g <sup>-1</sup> sausas / DW	Lupstāju lapas / Lovage leaves	SOXE
RS / RP	9971.14 mg AAE 100 g <sup>-1</sup> sausas / DW	Lupstāju lapas / Lovage leaves	SUB

Izvērtējot iepriekš iegūtos rezultātus par ekstrakcijas apstākļu un metožu ietekmi uz fenolu savienojumu saturu un antioksidantu aktivitāti ekstraktos, tālākiem eksperimentiem tika izvēlēti lupstāju lapu un kātu un mārrotku lapu ekstrakti, izmantojot Soksleta ekstrakcijas metodi ar etanolu.

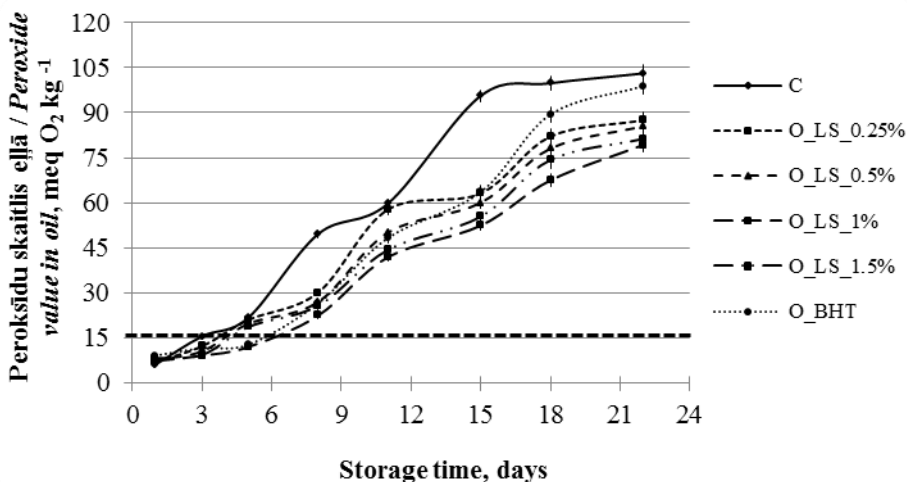
#### **4. Mārrotku un lupstāju ekstraktu ietekmes uz eļļas oksidēšanās kavēšanu izvērtējums**

Tā kā dabīgajiem fenolu savienojumiem piemīt antioksidatīvas un antimikrobiālas īpašības, tos ir iespējams izmantot tehnoloģiskajām vajadzībām kā alternatīvu sintētiskās pārtikas piedevām. Pārtikas produktos fenolu savienojumi izrāda aizsargājošu un stabilizējošu ietekmi uz lipīdiem, pārtikas krāsu un garšu (Kammerer et al., 2011). Mārrotku un lupstāju ekstrakti parāda antioksidantu aktivitāti, bet, lai pārliecinātos, ka tie arī efektīvi stabilizē lipīdus, mārrotku lapu, lupstāju lapu un kātu ekstrakti pievienoti nerafinētai rapšu eļļai. Eksperimentāli izvērtēta paaugstinātā temperatūrā un istabas temperatūrā gaismā/tumsā un tumsā izturētas nerafinētas rapšu eļļas ar pievienotu mārrotku lapu un lupstāju lapu un kātu ekstraktu stabilitāte.

Pirmajā posmā tika analizēta paaugstinātas temperatūras ietekme uz nerafinētas rapšu eļļas stabilitāti, uzglabājot eļļas paraugus tumsā 60±1 °C temperatūrā. Eksperimenta beigās eļļas paraugos būtiski (p<0,05) atšķīrās peroksīdu un hidroperoksīdu koncentrācija, bet ne brīvo taukskābju saturs.

Uzglabājot paaugstinātā temperatūrā, nerafinētas rapšu eļļas oksidēšanos ietekmēja pievienotie ekstrakti. Paaugstinātas temperatūras ietekmē kontroles

paraugs (neraфинēta rapšu eļļa bez piedevām – C) oksidējās visstraujāk, un pēc 22 uzglabāšanas dienām peroksīdu skaits bija  $103,08 \pm 2,75$  meq  $O_2$   $kg^{-1}$  eļļas (15. att.). Arī eļļas paraugam ar pievienotu 0,01% BHT (O\_BHT) notika salīdzinoši strauja oksidēšanās – pēc 22 uzglabāšanas dienām peroksīdu skaits bija  $98,87 \pm 2,59$  meq  $O_2$   $kg^{-1}$  eļļas. Lielāka spēja kavēt oksidēšanos šādos uzglabāšanas apstākļos bija eļļas paraugiem ar pievienotu lupstāju kātu ekstraktu 1% koncentrācijā (O\_LS\_1%), un pēc 22 uzglabāšanas dienām peroksīdu skaits bija  $79,26 \pm 1,94$  meq  $O_2$   $kg^{-1}$  eļļas. Arī eļļas paraugi ar pievienotiem lupstāju lapu (1%) un mārrutku lapu (1%) ekstraktiem efektīvi kavēja neraфинētās rapšu eļļas oksidēšanos.



\*\*\* Latvijas likumu aktos maksimāli pieļautais peroksīdu skaits / *Latvian legislation, the maximum allowed by the peroxide value* (15 meq  $O_2$   $kg^{-1}$  eļļas / oil) (MKN Nr.461 no 2014. gada).

### 15. att. Rapšu eļļas peroksīdu skaitļa izmaiņas, uzglabājot tumsā $60 \pm 1$ °C temperatūrā /

**Fig. 15. Changes of rapeseed oil peroxide value stored in dark at  $60 \pm 1$  °C temperature**

O\_LS\_0.25% - pievienotā lupstāju kātu ekstrakta koncentrācija eļļā 0,25% / *concentration of added lovage stems extracts in oil 0.25%*;

O\_LS\_0.5% - pievienotā lupstāju kātu ekstrakta koncentrācija eļļā 0,5% / *concentration of added lovage stems extracts in oil 0.5%*;

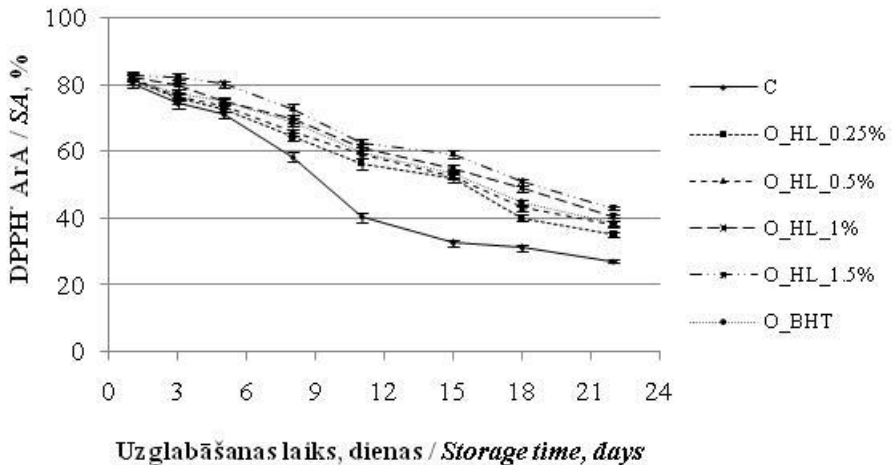
O\_LS\_1% - pievienotā lupstāju kātu ekstrakta koncentrācija eļļā 1% / *concentration of added lovage stems extracts in oil 1%*;

O\_LS\_1.5% - pievienotā lupstāju kātu ekstrakta koncentrācija eļļā 1,5% / *concentration of added lovage stems extracts in oil 1.5%*;

C – kontrole / *control*;

O\_BHT – eļļas paraugs ar pievienotu 0,01% BHT / *oil sample with added 0.01% BHT*.

Pēc 22 uzglabāšanas dienām, uzglabājot paaugstinātā temperatūrā tumsā, vislielākā eļļas antiradikālā aktivitāte saglabājās eļļas paraugam ar pievienotu 1,5% mārrutku lapu ekstraktu (42,86%) (O\_HL\_1.5%) un 1% lupstāju lapu ekstraktu (42,56%), kas bija būtiski ( $p < 0,05$ ) augstāka, salīdzinot ar kontroles paraugu (26,95%), kā arī ar eļļas paraugu ar pievienotu BHT (38,14%) (16. att.).



**16. att. Rapšu eļļas antiradikālās aktivitātes izmaiņas, uzglabājot tumsā 60±1 °C temperatūrā /**

**Fig. 16. Changes of rapeseed oil scavenging activity stored in dark at 60±1 °C temperature**

O\_HL\_0.25% - pievienotā mārrutku lapu ekstrakta koncentrācija eļļā 0,25% / concentration of added horseradish leaves extracts in oil 0.25%;

O\_HL\_0.5% - pievienotā mārrutku lapu ekstrakta koncentrācija eļļā 0,5% / concentration of added horseradish leaves extracts in oil 0.5%;

O\_HL\_1% - pievienotā mārrutku lapu ekstrakta koncentrācija eļļā 1% / concentration of added horseradish leaves extracts in oil 1%;

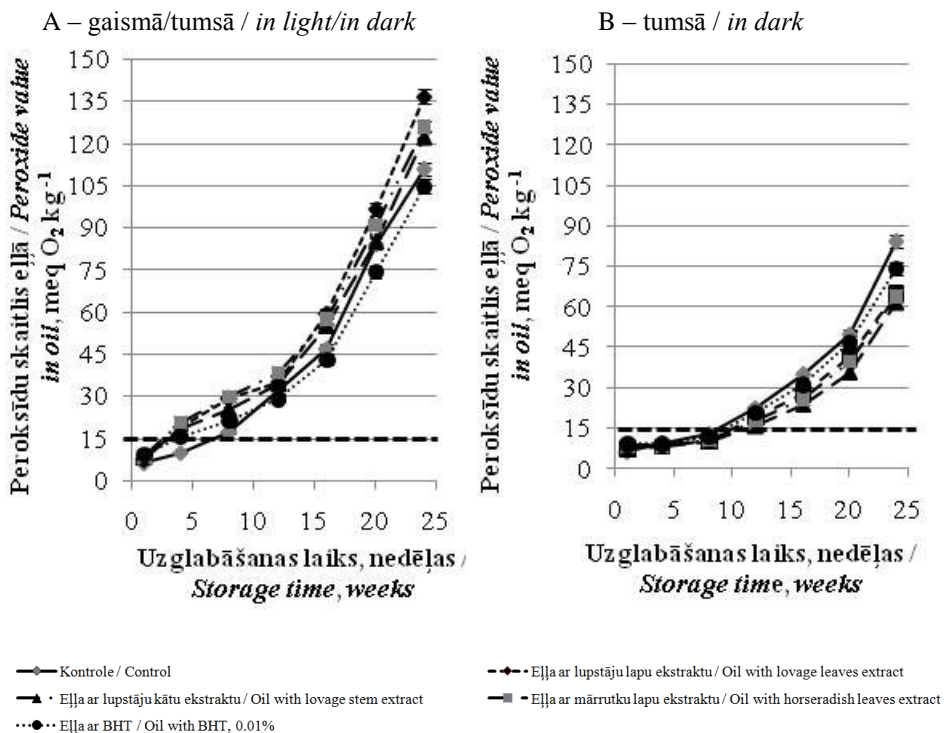
O\_HL\_1.5% - pievienotā mārrutku lapu ekstrakta koncentrācija eļļā 1,5% / concentration of added horseradish leaves extracts in oil 1.5%;

C – kontrole / control;

O\_BHT – eļļas paraugs ar pievienotu 0,01% BHT / oil sample with added 0.01% BHT.

Otrajā posmā, analizējot 22±1 °C temperatūrā gaismā/tumsā un tumsā uzglabātus eļļas paraugus, visefektīvākais starp pievienotajiem augu ekstraktiem bija lupstāju kātu ekstrakts. Tomēr, uzglabājot gaismā/tumsā 22±1 °C temperatūrā, pievienotie augu ekstrakti negatīvi ietekmēja eļļas stabilitāti, šie eļļas paraugi oksidējās būtiski ( $p < 0,05$ ) ātrāk nekā kontroles paraugs un paraugs ar sintētisko antioksidantu. Eļļas paraugs ar pievienotu lupstāju kātu ekstraktu (1%) demonstrēja vismazāko atšķirību no kontroles parauga (17. att. A).

Savukārt, uzglabājot tumsā  $22\pm 1$  °C temperatūrā, eļļas paraugi ar pievienotajiem ekstraktiem (1%) oksidējās būtiski ( $p<0,05$ ) lēnāk nekā kontroles paraugs un paraugs ar sintētisko antioksidantu (17. att. B). Pēc 24 uzglabāšanas nedēļām vismazāk oksidējies bija eļļas paraugs ar pievienotu lupstāju kātu ekstraktu, un tā peroksīdu skaitlis bija  $60,72$  meq  $O_2$   $kg^{-1}$  eļļas. Arī eļļas paraugiem ar pievienotajiem lupstāju lapu un mārrotku lapu ekstraktiem pēc 24 uzglabāšanas nedēļām peroksīdu skaitlis bija būtiski ( $p<0,05$ ) mazāks nekā kontrolei un paraugam ar sintētisko antioksidantu.



\*\*\* Latvijas likumu aktos maksimāli pieļautais peroksīdu skaitlis / Latvian legislation, the maximum allowed by the peroxide value ( $15$  meq  $O_2$   $kg^{-1}$  eļļas / oil) (MKN Nr. 461 no 2014. gada).

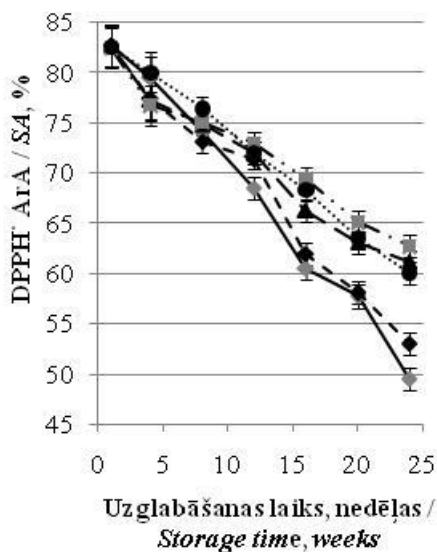
### 17. att. Rapšu eļļas peroksīdu skaitļa izmaiņas, uzglabājot $22\pm 1$ °C temperatūrā /

**Fig. 17. Changes of rapeseed oil peroxide value stored at  $22\pm 1$  °C temperature**

Savukārt istabas temperatūrā gan gaismā/tumsā, gan arī tumsā uzglabājot eļļas paraugiem lielāku DPPH<sup>•</sup> radikāļu saistīšanas spēju pēc 24 nedēļām saglabāja eļļas paraugs ar pievienotu 1% mārrotku lapu ekstraktu un 1% lupstāju kātu ekstraktu, kas bija būtiski ( $p<0,05$ ) augstāka, salīdzinot ar eļļas paraugu ar pievienotu BHT, kā arī kontroles paraugu (18. att.).

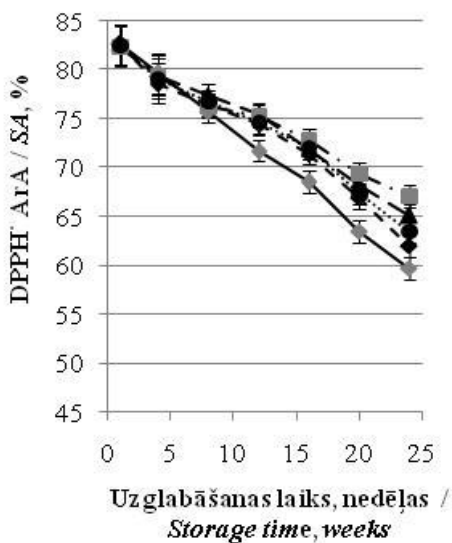


A – gaismā/tumsā / *in light/in dark*



—●— Kontrole / Control  
-▲- Eļļa ar lupstāju kātu ekstraktu / Oil with lovage stem extract  
...◆... Eļļa ar BHT / Oil with BHT, 0.01%

B – tumsā / *in dark*



—◆— Eļļa ar lupstāju lapu ekstraktu / Oil with lovage leaves extract  
-■- Eļļa ar mārrutku lapu ekstraktu / Oil with horseradish leaves extract

### 18. att. Rapšu eļļas antiradikālās aktivitātes izmaiņas, uzglabājot 22±1 °C temperatūrā /

*Fig. 18. Changes of rapeseed oil scavenging activity stored at  
22±1 °C temperature*

Eļļai pievienotie ekstrakti visefektīvākie izrādījās, uzglabājot eļļu tumsā paaugstinātā temperatūrā. Savukārt gaismā istabas temperatūrā savu negatīvo ietekmi demonstrēja no ekstraktiem neatdalītais hlorofils, kas veicināja eļļas oksidēšanos. Starp pievienotajiem ekstraktiem visos uzglabāšanas apstākļos efektīvākais eļļas oksidēšanās kavētājs bija lupstāju kātu ekstrakts, bet DPPH radikāļu saistītājs – mārrutku lapu ekstrakts.

## SECINĀJUMI

1. Mārrutku un lupstāju fizikāli ķīmiskos rādītājus būtiski ( $p < 0,05$ ) ietekmē genotips, auga daļa, kā arī novākšanas laiks. Gan mārrutkiem, gan arī lupstājiem lapās bija būtiski ( $p < 0,05$ ) lielāks fenolu savienojumu saturs un antioksidantu aktivitāte nekā saknēs.
2. Mārrutku un lupstāju lapās augstākais fenolu saturs konstatēts tūlīt pēc ziedēšanas, savukārt mārrutku saknēs un lupstāju kātos augstākā antioksidantu aktivitāte novērota nobriedušos augos. Salīdzinot mārrutkus un lupstājus, augstākie fenolu savienojumu un antiradikālās aktivitātes rādītāji bija mārrutku lapās, bet reducēšanas spējas rādītāji – lupstāju kātos.
3. Saldēšanas rezultātā lupstāju kātos palielinās fenolu savienojumu saturs un antioksidantu aktivitāte, lupstāju lapās – flavonoīdu saturs un reducēšanas spēja, mārrutku saknēs – rutīna un kafijskābes saturs.
4. Kaltējot sublimācijas kaltē, mārrutku saknēs samazinās fenolu savienojumu saturs un antioksidantu aktivitāte, bet pēc kaltēšanas mikroviļņu-vakuuma kaltē tajās palielinās antiradikālā aktivitāte, salīdzinot ar svaigām saknēm.
5. Palielinoties ekstrakcijas šķīdinātāja polaritātei, būtiski ( $p < 0,05$ ) palielinās fenolu savienojumu saturs un antioksidantu aktivitāte mārrutku un lupstāju ekstraktos.
6. Pagarinoties mikroviļņu iedarbības ilgumam, būtiski ( $p < 0,05$ ) samazinājās flavonoīdu saturs un antioksidantu aktivitāte mārrutku un lupstāju ekstraktos.
7. Mārrutku un lupstāju fenolu savienojumu un antioksidantu ekstrakcijai piemērotāka ir šķīdinātāja kritiskā (viršanas) temperatūra atmosfēras spiedienā.
8. Uzglabājot  $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$  un  $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā tumsā, pievienotie augu ekstrakti būtiski ( $p < 0,05$ ) kavē nerafinētas rapšu eļļas oksidēšanos, un to aktivitāte bija augstāka nekā sintētiskajam antioksidantam (BHT). Efektīvāks bija 1% lupstāju kātu ekstrakts.
9. Pētījumā iegūtie dati apstiprina izvirzīto hipotēzi – mārrutkos un lupstājos esošie antioksidanti kavē lipīdu oksidēšanos.

## IETEIKUMI RAŽOTĀJIEM

1. Soksleta ekstrakciju ar 95% etanolu ieteicams izvēlēties, lai iegūtu mārrutku un lupstāju ekstraktus ar augstāku bioloģiski aktīvo vielu saturu un antioksidantu aktivitāti.
2. Nerafinētās rapšu eļļas oksidatīvās stabilitātes palielināšanai, uzglabājot tumsā, var izmantot 1% lupstāju kātu vai mārrutku lapu ekstraktus.

## TOPICALITY OF THE RESEARCH

Nowadays consumers have become more knowledgeable about the use of biologically active compounds of natural origin, therefore these compounds may become economically significant in the nearest future. Recently there is an increasing interest in additives of plant origin (Brielman et al., 2006), the research activities of finding new antioxidants of natural origin which are as effective as synthetic antioxidants have been in the focus of attention (Pokorny, 2007; Michiels et al., 2012). Consequently, either new plants are searched or common but not widely used plants in local areas are studied.

There is a wide range of different plants in Latvia, some of them are found only in the wild, but some of them are cultivated. Horseradish (*Armoracia rusticana* L, family: *Brassicaceae*) and lovage (*Levisticum officinale* L, family: *Umbelliferae*) are typical aromatic plants grown in Latvia; they are not demanding as concerns their growing conditions. Horseradish is a common plant at present, but lovage is not so popular anymore. Since ancient times these plants have been used as healing herbs with a wide range of application for treatment of different diseases (Raghavan, 2000). Different research findings reveal that other plants of the same families (cabbage, turnips, rapeseed, rutabaga, mustard, black radish, radish, charlock etc. as well as dills, parsley, celery, coriander, cumin, fennel, ground-elder etc.) contain many biologically active substances with antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic properties.

Many biologically active compounds, i.e., phenols (phenolic acids, flavonoids, flavones), essential oils and others are widely found in plants (Naczka, Shahidi, 2004a). The functions and content of biologically active compounds may range depending on plant species, breed, genotype, type, the harvest time, the part of a plant as well as climatic conditions (Naczka, Shahidi, 2006). Some of these compounds synthesize better in the moderate climate characteristic of Latvia, though herbs may be less aromatic, but more rich in biologically active substances. Despite the fact that there is little information about the research conducted on chemical composition of horseradish and lovage, the assumption can be made that these plants also contain antioxidants which are necessary to research.

Chemical content of plants changes as a result of technological processes (drying, freezing) (Angela, Meireles, 2009). There is almost no information available in the scientific literature about the data on microwave-vacuum dried treatment as well as freeze dry treatment of horseradish and lovage. It is important that such kind of dried treatment of food products makes it possible to use the low temperature which causes the decrease of thermo-decomposition of biologically active compounds.

Some classes of biologically active compounds show antioxidant activity (AA) (Dykes, Rooney, 2007), therefore they could be used as oxidation inhibiting substances or antioxidants (Halliwell, 1999; Shahidi, 2000; Zou, Akoh, 2015; Kim et al., 2015). As regards food science and technologies, it is highly

recommended to add antioxidants to control oxidation providing relevant food quality (Pokorny, 2007).

Biologically active compounds are influenced by extraction conditions (Angela, Meireles, 2009), therefore new, updated extraction methods to isolate biologically active compounds from the plant material are applied: ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction, accelerated solvent extraction, supercritical extraction as well as subcritical extraction. Comparing with traditional extraction methods, they are distinguished by shorter extraction time, lower extraction temperature, smaller extraction solvent volume, selectivity etc., allowing to increase the expected outcome of compound extraction and reduce its degradation of various types.

Due to antioxidant and antimicrobial properties of phenols, they are possible to use as an alternative to synthetic antioxidants. They have a protecting and stabilizing influence on lipids, the colour and taste of food products. Phenolic compounds have a great structural variety that are reflected in their diverse biological functions. Therefore plant extracts whose phenolic profile differs might have various physiological effects (Valls et al., 2009; Kammerer et al., 2011).

The research on effectiveness of added plant extracts on lipid stabilization has drawn a lot of attention in recent years, and the extracts of such widely known plants as oregano and rosemary have turned out to be very effective (Bhale et al., 2007; Pawar et al., 2012). Therefore it is important to investigate the properties of local plants and find ways of using them for the improvement of food product quality.

**The hypothesis** of the doctoral thesis: the antioxidants in horseradish and lovage inhibit lipid oxidation.

**The aim** of the doctoral thesis is to evaluate biologically active substances of horseradish and lovage, their extraction and application opportunities.

**The object** of the doctoral thesis is horseradish (*Armoracia rusticana* L.) and lovage grown in Latvia (*Levisticum officinale* L.).

**Theses:**

1. A genotype, a part of the plant and the harvest time affect chemical composition of horseradish and lovage.
2. The phenolic content and antioxidant activity is higher in frozen horseradish and lovage than in dried horseradish and lovage.
3. The application of polar solvents increases the content of flavonoids and antioxidant activity in horseradish and lovage extracts.
4. The duration of microwaves and ultrasound waves influences the content of phenols and antioxidant activity in horseradish and lovage extracts.
5. The increased temperature and pressure increase the content of phenols and antioxidant activity in horseradish and lovage extracts.
6. Horseradish and lovage extracts are more effective antioxidants than *butylhydroxytoluene* (BHT).

To achieve the aim, the following **tasks** have been set:

1. to analyze the changes in chemical parameters of plant parts of different genotypes of horseradish and lovage depending on their harvest time;
2. to evaluate the most effective fresh horseradish and lovage treatment methods for the purpose of maintaining phenolic compounds and antioxidant activity;
3. to analyze the influence of solvent polarity on the content of phenols and antioxidant activity in horseradish and lovage extracts;
4. to evaluate the effect of microwave and ultrasound wave treatment duration on the content of phenols and antioxidant activity in horseradish and lovage extracts;
5. to analyze the effect of increased temperature and pressure on the content of phenols and antioxidant activity in horseradish and lovage extracts;
6. to study the effect of horseradish and lovage extracts on oxidation of unrefined rapeseed oil.

The **novelty and scientific significance** of the research.

1. The detailed research has been conducted for the first time on the chemical composition of various parts of plants of horseradish and lovage of different genotypes grown in Latvia depending on the harvest time.
2. The changes in the content of phenolic compounds (rutin, caffeic acid, chlorogenic acid, catechin etc.) in horseradish and lovage depending on the treatment method (freezing, microwave-vacuum dried treatment, freeze-drying) have been studied.
3. The effect of different solvents, the duration of ultrasound treatment and microwave treatment as well as the effect of subcritical condition and accelerated solvent extraction on the content of phenolic compounds and natural antioxidant activity in horseradish and lovage extracts have been researched.
4. It has been proved that horseradish and lovage are the potential extraction source of natural antioxidants.

The **economic significance** of the doctoral thesis.

Horseradish and lovage grown in Latvia contain biologically active compounds which may be used for obtaining extracts rich in natural antioxidants. The extracts of horseradish and lovage leaves and stems are more effective oxidation inhibitors than synthetic antioxidant *butylhydroxytoluene* (BHT).

The research was supported by the National Research programme "Agriculture Resources for Sustainable Development for Qualitative and Healthy Food Development in Latvia (AgroBioRes)" (2014.–2017.), Project No4 "Sustainable Use of Local Agricultural Resources for Development of Qualitative and Healthy Food Products (PĀRTIKA)", as well as Project No. K24 "Comparison of Content and Properties of Currently Unused Aromatic Plants and Mushrooms in Latvia and Midi-Pirenees" (2012.–2013.) within the framework of the cooperation programme between Latvia and France in science and technology development areas "OSMOZE".

## APPROBATION OF THE RESEARCH

The results of the research were summarized and published in 2 subchapters of a monograph, and 11 peer reviewed scientific publications.

The results of the research have been presented in 14 international scientific conferences and congresses in Latvia, Lithuania, Estonia, Greece, Portugal, France, Macedonia, Russia, the exhibitions “Riga Food 2013”, ”Riga Food 2014” (the list of publications and attended conferences see on pages 7–9).

## Materials and methods

### Time and place of the research

The experiments have been conducted in the time period from 2011 to 2015 at:

- the Latvia University of Agriculture, the Department of Food Technology, the Laboratory of Food Product Analysis (moisture content) and the Research Laboratory of Packaging Material Properties (the content of volatile compounds), the Research Laboratory of Chemistry of Natural Substances of the Department of Chemistry (individual phenolic compounds) and the Laboratory of Organic Chemistry (extraction according to the conventional method, Soxhlet method, microwave assisted extraction and ultrasound assisted extraction, as well as the total content of phenols, the total content of flavonoids, scavenging activity (SA) (2,2-diphenyl-1-picrylhydrozyl - DPPH<sup>•</sup>, 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) - ABTS<sup>•+</sup>) and the reducing power (RP));
- the Toulouse National Polytechnic Institute, the Laboratory of Agro-Industrial Chemistry (accelerated solvent extraction and subcritical extraction).

### Materials used for the research

Horseradish genotypes grown in Pure Horticultural Research Centre, Plc, and lovage genotypes grown in different regions of Latvia were used in the experiment. They were harvested in 2011, 2012 and 2013 in the time period from June until November (plant material used in each investigation is included in the research description, but the exact harvest time is included in the description of the research stages). Plant material was harvested and then stored for 1-2 weeks in the refrigerator at the temperature of  $+4\pm 1$  °C, with relative air humidity 90–95%. The research used 12 genotypes of horse radish (G1, G2, G3, G12B, G26B, G104, G105, G106, G280, G281, GM and GJ) and 4 genotypes of lovage (L1, L2, L3 and L4).

Unrefined rapeseed oil from “Iecavnieks”, Ltd (Latvia), was used in the research on horseradish leaves’, lovage leaves’ and lovage stems’ ability to stabilize oil during storage. Oil was packed in transparent plastic (PET) bottles (volume 5 l).

### Research structure

The research included four stages of the analyses of physical and chemical parameters of fresh and processed horseradish and lovage, the influence of extraction conditions as well as the effect of extracts on the stability of oil.

### **Stage I: Analysis of biologically active compounds of horseradish and lovage**

The first stage focused on the analysis of the effect of the harvest time and parts of plants on the biologically active compounds of horseradish and lovage of various genotypes. The structure of the the first stage is presented in Fig.1

### **Stage II: Evaluation of biologically active compounds in horseradish and lovage depending on the type of treatment**

The effect of freezing and drying on the content of phenolic compounds in horseradish and lovage and AA was analyzed (Fig.2). Fresh plant material samples were used as control samples.

### **Stage III: Evaluation of the effect of extraction conditions**

The research focused on the analysis of the changes of content of phenolic compounds and antioxidant activity (AA) as a result of various extraction parameters (solvents, microwave, ultrasound, temperature and pressure) (Fig.3). Six extraction methods were used in the experiments – conventional extraction (CONV), Soxhlet extraction (SOXE), ultrasound assisted extraction (UAE), microwave assisted extraction (MAE), accelerated solvent extraction (ASE) and subcritical extraction (SUB).

### **Stage IV: Evaluation of the effect of extracts on the stability of oil**

The structure of the research is presented in Figure 4. Three different extracts were added to unrefined rapeseed oil: lovage leaves extract, lovage stems extract and horseradish leaves extract that were extracted with the Soxhlet extraction method by using ethanol, afterwards being evaporated under vacuum until a complete solvent removal. Each extract was added in four different concentrations (0.25%; 0.5%; 1% and 1.5%).

Oil samples were stored in 3 different conditions:

- at increased temperature ( $60 \pm 1$  °C) in the darkness, in the thermostat *Memmert* (Germany);
- at  $22 \pm 1$  °C in the light/dark conditions;
- $22 \pm 1$  °C in the darkness.

### **Indices determined in the research and the research methods**

Methods used for the analyses of the samples of horseradish and lovage, their extracts and the samples of oil are presented in Table 1.

#### **Statistical Analysis and Interpretation of Data**

Statistical analysis was used to analyze the obtained data. The calculations were performed by Microsoft Excel programme and SPSS 17.0 programme. The mean values and the standard deviation were calculated for the obtained results.

The hypothesis was tested with p value method, and differences were considered significant at  $p\text{-value} < \alpha_{0.05}$ . The following statistical methods were used in the research: the analysis of variance (ANOVA), correlation and regression analysis, Tukey's test as well hierarchical cluster method.

\* Mean values marked with the same letter do not differ significantly at  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Analysis of the most significant biologically active compounds and their antioxidant activity in horseradish and lovage

The research focused on the analysis of the most significant biologically active compounds in fresh roots and leaves of 12 horseradish genotypes and fresh roots, stems and leaves of 4 lovage genotypes. The results of the experiments show that the content of biologically active substances differs significantly in different parts of a plant and the content is affected by a genotype and the harvest time.

**Phenolic compounds.** In all analyzed plant material the total phenolic content (TPC) was within  $94.69 \pm 2.89$  mg GAE  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight to  $5406.21 \pm 28.00$  mg GAE  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight and the highest result was in the leaves of horseradish genotype G12B (Fig.5).

Horseradish leaves had the highest phenolic content among the analyzed samples, but phenolic content in horseradish roots was up to 25 times less than in the leaves. The same trend was observed in lovage since the content of phenolic compounds in lovage leaves was 2 times higher than the content of phenolic compounds in stems and 5 times higher than those in roots (Fig.6).

Using hierarchical cluster analysis the samples of horseradish roots by TPC can be divided into clusters, there is a homogeneous group, with the exception of genotypes of G280 and G281, which showed the highest results.

The same features were observed in total flavonoid content (TFC) parameters. The experiments showed that out of all analyzed plant material horseradish leaves of genotype G12B had the highest TFC ( $15510.20 \pm 37.09$  mg CE  $100\text{ g}^{-1}$  dry weight), but horseradish roots of genotype G105 have the lowest TFC ( $105.70 \pm 8.29$  mg CE  $100\text{ g}^{-1}$  dry weight).

The analysis of the samples in the experiments showed that the largest amount of identified individual phenolic compounds were found in lovage stems of genotype L3: caffeic acid was  $95.03 \pm 0.18$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight, chlorogenic acid –  $85.91 \pm 0.16$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight and rutin  $67.72 \pm 0.11$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight.

**Vitamin C.** The results of the experiments showed that the content of Vitamin C was noticeably higher in horseradish roots than in lovage samples. The content of vitamin C in different horseradish genotypes ranged significantly from  $71.10$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight dry weight ( $23.97 \pm 0.89$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  fresh condition) to  $344.93$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight ( $97.63 \pm 0.94$  mg  $100\text{ g}^{-1}$  fresh condition) in horseradish roots of respective genotypes G26B un GM (Fig.7).

As regards lovage roots, the content of Vitamin C was much lower in lovage roots than in horseradish roots and ranged from  $12.46$  (L1) to  $21.84$  (L3) mg  $100\text{ g}^{-1}$  fresh condition or from  $18.98$  (L1) to  $40.32$  (L3) mg  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight.

**Volatile compounds.** The major volatile compound was allyl isothiocyanate (AITC) in all horseradish accounting for 64–82% from total identified volatile



compounds (Table 2), and the largest amount was found in the roots of the genotype G1, the lowest amount in the roots of G106.

This division into clusters differs from the division into clusters which is based on the content of phenolic compounds. It is explained by the fact that formation of volatile organic compounds and phenolic compounds are caused by different biosynthetic processes (Velišek, Cejpek, 2008).

**Antioxidant activity.** During the experiments the highest AA was found in lovage stems of the genotype L4. Scavenging activity was  $178.55 \pm 3.37$  mM TE  $100 \text{ g}^{-1}$  of dry weight analysing with DPPH $\cdot$  method, but reducing power was  $45595.71 \pm 99.31$  mg AAE  $100 \text{ g}^{-1}$  of dry weight. The lowest scavenging activity was found in horseradish roots of the genotype GM ( $2.30 \pm 0.04$  mM TE  $100 \text{ g}^{-1}$  of dry weight) with DPPH $\cdot$  method, but the lowest reducing power was found in lovage roots of the genotype L2 ( $266.46 \pm 20.06$  mg AAE  $100 \text{ g}^{-1}$  of dry weight). The tendency was revealed that lovage of genotype L2 had the lowest reducing power in roots, stems and leaves (Fig.8.)

Several authors have found evidence that chemical content of plants depends in the time of harvest (Koh et al., 2009), development stage (Björkman et al., 2011) and growing conditions (Podsędek, 2007; Kusznierevicz et al., 2008). The results of this research show that each analyzed plant material should be harvested in various harvest times to obtain the maximum performance (Table 3).

Hierarchical cluster analysis was performed to classify data from 5 variables (TPC, TFC and SA and PIA) and 36 plant materials resulting in the classification of the samples of horseradish leaves, roots, and lovage roots, stems and leaves into 8 clusters. In separate clusters horseradish genotype G2 and G12B with highest TPC and TFC and SA were classified.

## **2. Changes in the content of biologically active compounds and antioxidant activity in horseradish and lovage depending on the type of technological process**

Herbs and vegetables are perishable therefore freezing and drying are applied for extending the availability of plants throughout the year. The research finding of other scientists report that drying and freezing affect the content of biologically active compounds and AA in plants (Pinelo et al., 2004; Chan et al., 2009; Siriamornpun et al., 2012; Chan et al., 2013). The most common treatment is traditional or conventional treatment that is possible to implement with moderate production capacity. One type of treatment entitled freezing plant material at the temperature of  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  and then storing it at the temperature of  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , the second type of treatment entitled drying in the darkness in the room temperature without additional air circulation until reaching a certain level of moisture of a product. The conventional types of treatment in the doctoral research were applied for horseradish leaves of the genotype GJ and lovage leaves and stems of the genotype L1 in order to perform the analysis of the content of phenolic compounds and their AA.

The most appropriate treatment for lovage leaves, stems and horseradish leaves is freezing since TPC and TFC increase (Table 4).

The content of phenolic compounds decreased significantly in all analyzed samples in comparison with fresh samples, TPC decreased 4.43 times and TFC decreased 5.38 times in lovage leaves in comparison with fresh lovage leaves. The highest amount of flavonoids was found in frozen horseradish and lovage leaves, the lowest amount of them was found in dried horseradish and lovage leaves.

Besides, AA was higher in frozen lovage stems and leaves than in fresh ones. Complex compounds decompose due to freezing which results in increased reducing power and ABTS<sup>•+</sup> scavenging activity.

The duration of conventional drying treatment is long, therefore more updated treatments were considered with the aim to shorten the drying period. Microwave-vacuum and freeze dried methods were chosen for the research in order to analyze their effect on the horseradish root samples of the genotype GJ. Microwave-vacuum drying is an effective treatment method for fast product dehydration at normal temperature and it is used to dry products of different plant origin. Varying microwave power it is possible to preserve the maximum nutritional value of the treated product (Dorofejeva et al., 2011; Kruma et al., 2011). Freezing and drying parameters for the further research were based on the findings of other scientists to analyze the extension possibilities of the usability of horseradish roots.

The amount of rutin and caffeic acid (Fig. 9) as well as ABTS<sup>•+</sup> scavenging activity and reducing power increased in horseradish roots as a result of freezing.

The content of phenolic compounds and their antioxidant activity decreased in the case of traditional drying as well as in the case of freeze dried treatment. Micro-wave vacuum treatment resulted in the increase of ABTS<sup>•+</sup> scavenging activity in horseradish roots comparing to fresh ones (Table 5).

Hierarchical cluster analysis was performed to classify data of horseradish and lovage analysis in different treatments using 5 variables (TPC, TFC and SA and RP) and 13 samples. Consequently, plant samples with the highest content of phenolic compounds (fresh and frozen lovage leaves) were grouped in a separate cluster, but the samples with the highest RP (fresh and frozen lovage leaves) were grouped in another cluster.

### **3. Evaluation of effect of extraction conditions on content of biologically active compounds in horseradish and lovage extracts**

The analysis of freeze dried samples showed that the content of biologically active compounds in horseradish and lovage extracts is significantly influenced by the polarity of extraction solvent, duration of extraction, extraction temperature and pressure, as well as extraction method that was analyzed using freeze dried samples.

#### **Evaluation of solvent effect on extraction**

Two common extraction methods, namely, conventional method and Soxhlet method were chosen for the evaluation. These are the methods where one of variable extraction parameters is solvent. Seven solvents were applied, each with different

polarity. The conventional extraction was performed in the temperature of surrounding environment, but Soxhlet extraction was performed in the temperature of solvent boiling point. The results of variance analysis showed that the applied solvent and an extraction method are significant factors affecting the content of phenolic compounds and AA ( $p < 0.05$ ).

Solvent polarity plays a key role in increasing of solubility of phenolic compounds (Naczka, Shahidi, 2006). The research results showed that the increase of solvent polarity increased the content of phenols in all analyzed plant materials.

TPC increased in horseradish leaves' extracts by 42 times on average (Fig.10), however, TPC ranged from  $39.31 \pm 1.65$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  of dry weight (with HE) to  $2327.68 \pm 4.03$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  of dry weight in lovage leaves' extracts (Fig.11.) when Soxhlet extraction method was applied.

The applied solvent polarity as well as the chosen extraction method significantly influenced AA, besides, this trend was more typical of Soxhlet extraction method. By increasing solvent polarity, scavenging activity increased four times and reducing power increased six times on average.

The analysis of all results showed that the best extracts were obtained by using Soxhlet extraction method with high polarity solvents (Table 6).

#### **Evaluation of microwave and ultrasound effect**

Ultrasound assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) were chosen to evaluate the effect of ultrasound waves and microwaves. One of variable indices of these extractions is the duration. The results of evaluation of solvent effect on extraction showed that ethanol is one of the best solvents therefore ethanol was applied to UAE and MAE. During UAE sound waves with mechanic vibration affect solids and liquids causing an enlargement in the pores of the cell walls enhancing diffusion process and increasing mass transfer (Angela, Meireles, 2009). As regards MAE, microwaves break solid cell walls releasing phyto-chemicals (Wu et al., 2012). In the latter extraction method increased temperature ( $50 - 77 \text{ }^\circ\text{C}$ ) has a certain influence.

The results of variance analysis showed that the duration of extraction and an extraction method were significant factors that influence TPC, TFC as well as their AA ( $p < 0.05$ ).

The analysis of individual indices showed that both methods did not have similar tendencies, in addition, the analyzed plant material demonstrated different features.

In the case of UAE a trend was observed that the longer extraction duration yielded higher phenolic content and antioxidant activity. In the case of UAE there was a correlation between TFC and ABTS cation-binding capacity ( $r = 0.88$ ), therefore it was possible to forecast that flavonoids in lovage leaves would act as radical ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ) bonders.

There was a correlation between TPC and TFC in horseradish leaves extracts, where the comparison extracts and the extraction time – 15 s and 1800 s showed that TPC increased by 4.63 times and TFC increased by 4.89 times (Fig. 12.), however, there was not any correlation between these increases and AA (Fig.11).

As regards **MAE** results, different tendencies in analyzed horseradish and lovage extracts were observed. Longer extraction duration in horseradish extracts caused the decrease in phenolic content, but increase in SA. Especially it was obvious in horseradish root extracts of genotype G106 and G12B, in which longer extraction duration caused the decrease in TPC by 2.33 and 1.8 times, respectively (Fig. 13), but DPPH radical bonding activity increased by 1.55 and 1.47 times, respectively (Fig.13).

Other analyzed extracts of plant materials had slightly different results and longer extraction time caused the decrease in all indices (Fig.14).

Having compared extracts obtained in ultrasound assisted extraction and microwave assisted extraction (Table 7), it could be concluded that it is not possible to determine a universal extraction method and duration to all plant materials.

### **Evaluation of the effect of extraction temperature and pressure**

Several methods – conventional (CONV) extraction, Soxhlet (SOXE), subcritical condition (SUB), as well as accelerated solvent (ASE) extraction using ethanol as solvent were used to evaluate changes in the content of phenolic compounds and AA in the extracts of lovage leaves and stems and horseradish roots according to the temperature and pressure conditions. The specifications of the extraction conditions are described in Table 8. There is not any available information about similar research on the application of subcritical and accelerated solvent extraction for antioxidant extraction from horseradish and lovage.

The results of the analysis of variance showed that both plant material and an extraction method are significant factors that affect TPC, TFC as well as their AA ( $p < 0.05$ ).

The findings showed that flavonoids in lovage were similarly bound in plant cells and they show similar thermo-stability, while flavonoids in horseradish roots were rather thermo-stable therefore they were released from their bound compounds only under certain temperature and pressure mode (Table 9). Besides, the content of flavonoids had the tendency to increase at higher temperatures, and TFC in SOXE extracts was as much as 6 times higher comparing with CONV extracts. As regards higher pressure mode, there was not a significant difference found or the extraction occurred either above or under the critical solvent point. However, when the temperature stayed at the same level, the increased pressure caused the decrease of TFC that could be explained by flavonoid degradation caused by the pressure similar to the case of TPC. The highest TPC and TFC was found in lovage leaves, but the lowest TPC and TFC was found in horseradish roots regardless of the extraction method.

Comparing AA of the extracts, the findings showed that better results were obtained using extractions at higher temperature mode (complex compounds with weak antioxidant capacity at the high temperature are cleaved resulting in the release of compounds with strong scavenging activity), but lower results were obtained using the conventional extraction method (Table 10).

Extracts from lovage stems showed the tendency that the SOXE extraction method was the most effective in all analyzed parameters, besides, this extraction

method was one of the most appropriate for horseradish roots extracts and lovage leaves extracts. Consequently, the SOXE method could be considered as an effective extraction method for extracting phenolic compounds and natural antioxidants from horseradish roots and lovage leaves and stems.

The results gave evidence that solvent becomes most effective in obtaining phenolic compounds at critical temperature, but its effectiveness decreases when heating takes place above critical temperature (Table 11) because thermic degradation of phenolic compounds occurs; as a result decomposition products with low molecular weight are obtained (Schieber et al., 2001; Ignat et al., 2010).

The highest results were found in lovage leaves extracts, but the lowest results were found in horseradish roots extracts regardless of an extraction method.

The findings of the present research suggest that it is not possible to recommend the most appropriate extraction method suitable for all plant materials. It could be explained by the fact that all analyzed plant materials are different concerning their biological structure; either phenolic compounds are synthesized depending on the presence of respective enzymes or they are bound in various ways.

Having estimated the obtained results on the effect of extraction conditions and methods on the content of phenolic compounds and antioxidant activity in extracts, the extracts of lovage leaves and stems as well as horseradish leaves were selected applying Soxhlet extraction method with ethanol.

#### **4. Evaluation of horseradish and lovage extracts effect on oil oxidation inhibition**

Since natural phenolic compounds possess antioxidant and antimicrobial properties, it is possible to use them as alternative to synthetic food supplements for technological purposes. Phenolic compounds in food products provide protecting and stabilizing effect on lipids, food colour and taste (Kammerer et al., 2011). Horseradish and lovage extracts show antioxidant activity, and, the extracts of horseradish leaves, lovage leaves and stems are added to unrefined rapeseed oil to be sure that they stabilize lipids effectively. The stability of unrefined rapeseed oil stored at the increased temperature and room temperature in the light/darkness and darkness with added extracts of horseradish leaves and lovage leaves and stems were experimentally evaluated.

In the first stage the effect of increased temperature on the stability of unrefined rapeseed oil, storing oil samples in the darkness at the temperature of  $60\pm 1$  °C was analysed. At the end of the experiment there was a significant difference ( $p<0.05$ ) between the concentration of peroxides and hydro-peroxides in oil samples, however, there was not a significant difference for free fatty acids.

The added extracts influenced the oxidation of unrefined rapeseed oil during the storage at the increased temperature. The control sample (unrefined rapeseed oil without additives) at the increased temperature oxidized at higher speed and after 22 storage days the peroxide value was  $103.08\pm 2.75$  meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> of oil (Fig. 15). Besides, the oil sample with added 0.01% BHT oxidized comparatively fast – after

22 storage days the peroxide value was  $98.87 \pm 2.59$  meq  $O_2$   $kg^{-1}$  of oil. Even stronger ability to inhibit oxidation in such storage conditions was demonstrated by the oil samples with added lovage stems extract in 1% concentration (after 22 storage days the peroxide value was  $79.26 \pm 1.94$  meq  $O_2$   $kg^{-1}$  of oil). The same regards to oil samples with added extracts of lovage leaves (1%) and horseradish leaves (1%) that inhibited oxidation of unrefined rapeseed oil effectively.

After 22 storage days, storing samples at the increased temperature in the darkness, the highest scavenging activity was maintained in the sample with added 1.5% extract of horseradish leaves (42.86%) and 1% extract of lovage leaves (42.56%) that were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in comparison with the control sample (26.95%), as well as the oil sample with added BHT (38.14%) (Fig. 16).

In the second stage analyzed oil samples stored in the light/darkness and darkness at  $22 \pm 1$  °C was analysed. The results showed that the most effective among the added plant extracts was the extract of lovage stems. However, the added plant extracts had a negative effect on oil stability storing them in light/darkness at the temperature of  $22 \pm 1$  °C; these oil samples oxidized significantly faster ( $p < 0.05$ ) than the control sample and the sample with the synthetic antioxidant. The oil sample with added extract of lovage stems (1%) demonstrated the least difference with the control sample (Fig. 17, A).

As regards the storage of samples in the darkness at the temperature of  $22 \pm 1$  °C, the oil samples with added extracts (1%) oxidized significantly slower ( $p < 0.05$ ) than the control sample and the sample with synthetic antioxidant (Fig.17, B). After 24 storage weeks the oil sample with added extract of lovage stems was the least oxidised and its peroxide value was  $60.72$  meq  $O_2$   $kg^{-1}$  of oil. Besides, peroxide value was significantly lower ( $p < 0.05$ ) for oil samples with the added extracts of lovage leaves and horseradish leaves than the control sample and the sample with synthetic antioxidant after 24 storage weeks.

As regards storing oil samples in room temperature in the light/darkness and in darkness, higher DPPH radical bonding capacity after 24 weeks was observed in the oil sample with added 1% extract of horseradish leaves and 1% extract of lovage stems that was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in comparison with the oil sample with added BHT as well as the control sample (Fig. 18).

Thus, the research findings show that the most effective turned out to be extracts added to oil stored in the darkness at the increased temperature. As regards the conditions of the light and the room temperature, the negative effect was demonstrated by chlorophyll that was not separated from extracts and enhanced oil oxidation. In all storage conditions the extract of lovage stems was the most effective oil oxidation inhibitor, but the extract of horseradish leaves had the most effective DPPH radical bonding capacity.

## CONCLUSIONS

1. The physical and chemical parameters of horseradish and lovage were significantly affected ( $p < 0.05$ ) by a genotype, a part of the plant and the harvest time. Both horseradish and lovage had significantly higher ( $p < 0.05$ ) content of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves than in roots.
2. The highest phenolic content in horseradish and lovage leaves was found right after the blooming; as regards antioxidant activity in horseradish roots and lovage stems, the highest level was found in mature plants. Comparing horseradish and lovage, the highest level of phenolic compounds and scavenging activity was found in horseradish leaves, but the highest reducing power was found in lovage stems.
3. In freezing conditions the content of phenolic compounds and antioxidant activity increased in lovage stems, the content of flavonoids and reducing power increased in lovage leaves, but the content of rutin and caffeic acid increased in horseradish roots.
4. Freeze-drying caused the decrease of the content of phenolic compounds and antioxidant activity in horseradish roots, but microwave vacuum drying treatment increased scavenging activity in horseradish roots comparing with fresh roots.
5. The increase of the polarity of extraction solvent caused a significant increase ( $p < 0.05$ ) of the content of phenolic compounds and antioxidant activity in horseradish and lovage extracts.
6. The increase of the duration of microwave treatment significantly ( $p < 0.05$ ) decreased the content of flavonoids and antioxidant activity in horseradish and lovage extracts.
7. The boiling temperature under atmospheric pressure was more appropriate for extraction of phenolic compounds and antioxidants in horseradish and lovage.
8. Storage at +22 °C and 60 °C temperature in the darkness added plant extracts significantly ( $p < 0.05$ ) inhibited oxidizing of unrefined rapeseed oil and their activity was higher than that of synthetic antioxidant (BHT). Lovage stems (1%) extract was more effective.
9. The data obtained in the research confirm the hypothesis: antioxidants in horseradish and lovage inhibit lipid oxidizing.

## RECOMMENDATIONS FOR MANUFACTURERS

1. Soxhlet extraction with 95% ethanol is recommended in order to obtain horseradish and lovage extracts with higher content of biologically active substances and antioxidant activity.
2. 1% extracts from lovage stems or horseradish leaves can be used to increase oxidizing stability of unrefined rapeseed oil stored in the darkness.

**Lolita Tomsone**  
Latvijas Lauksaimniecības universitāte  
Pārtikas tehnoloģijas fakultāte  
*LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE*  
*FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY*  
**lolitatomsone@gmail.com**