

УДК 664.3:602

О.І. Осецький¹, С.С. Севаст'янов¹, В.В. Євлаш²,
В.О. Потапов², І.С. Пілюгіна², Д.В. Білий^{2*}

Низькотемпературна екстракція ліпідних фракцій з рослинної сировини за допомогою зріджених хладонів

UDC 664.3:602

O.I. Osetskyi¹, S.S. Sevastianov¹, V.V. Yevlash²,
V.O. Potapov², I.S. Piliugina², D.V. Bilyi^{2*}

Low-Temperature Extraction of Lipid Fractions from Vegetable Raw Materials Using Liquefied Freons

Реферат: У роботі розглянуто технологію криогенного екстрагування зрідженими хладонами. За допомогою устаткування для екстракції ліпідних фракцій з біологічної сировини експериментально одержано хладоновий екстракт листя лавра. У процесі вилучення зрідженими хладонами вперше реалізовано низькотемпературну екстракцію ліпідних фракцій лаврового листа при $-2...-8^{\circ}\text{C}$. Показано відмінність складу даних фракцій від складу олій, одержуваних у традиційних температурних діапазонах $30...50^{\circ}\text{C}$. Представлено залежність маси кінцевого продукту від тривалості екстракції у результаті трьох послідовних циклів по 23 години кожен. Методом газової хроматографії ідентифіковано 68 компонентів хладонового екстракту, визначено їх кількісний склад і домінуючі сполуки. Встановлено вміст ефірних олій та ароматоутворюючих речовин, які обумовлюють число аромату. Отримані результати можуть стати основою для нових технологічних підходів до поділу ліпідних фракцій, що виділяються з біологічної сировини рослинного і тваринного походження. Описано варіант устаткування з триступеневою криогенною системою рекуперації хладонових розчинників для ефективної реалізації розробленої технології.

Ключові слова: лавровий лист, низькотемпературні технології, зріджений хладон R406A, екстракт, газова хроматографія, число аромату.

Abstract: This paper presents the method of cryogenic extraction by means of liquefied freons. Using the equipment to extract lipid fractions from biological raw materials, a freon extract from bay leaves (*Laurus nobilis*) was experimentally obtained. A low-temperature extraction of lipid fractions from bay leaves was first realized using liquefied freons within the temperature range of $-2...-8^{\circ}\text{C}$. The difference in composition of these fractions from that of the oils, obtained within the standard temperature ranges of $30...50^{\circ}\text{C}$ was shown. Dependence of the finished product weight on extraction time as a result of three consecutive cycles of 23 hrs each was demonstrated. Using gas chromatography, 68 components of freon extract were identified, and their quantitative composition and dominant compounds were detected. The content of essential oils and aroma-forming substances, stipulating the number of odour units was specified. These findings may be the basis for novel technological approaches to separation of lipid fractions, isolated from biological raw materials of plant and animal origin. Here, we described the device version with a three-stage cryogenic system of freon solvent recovery for effective implementation of the designed technology.

Key words: bay leaf, low-temperature technologies, liquefied freon R406A, extract, gas chromatography, number of odour units.

Низькі температури та криогенні технології знаходять все більшого застосування під час створення інноваційних методів з перероблення біологічної сировини. Варто зазначити, що у високоякісній переробці біологічного матеріалу криогенні технології не мають альтернативи.

У фахівців харчовій промисловості збільшилась зацікавленість у використанні біологічно активних речовин, які отримують з рослинної сировини. Їх використовують як у вигляді окремих чистих речовин, так і у складі домішок до інших харчових продуктів. Вітаміни, мікроелементи, не-

The low temperatures and cryogenic techniques are increasingly applied in designing the innovations for processing biological raw materials. It is noteworthy, that cryogenic technologies have no alternative in high-quality processing of biological material.

Currently, the food industry shows a growing interest in applying biologically active substances, derived from plant raw materials. They are used both as individual pure substances and as admixtures to other food products as well. Vitamins, microelements, unsaturated fatty acids, contained in medicinal and food products allow to optimize

¹ Інститут проблем криобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

² Державний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Алчевських, 44, м. Харків, Україна 61002;
тел.: (+38 063) 121-78-75
електронна пошта: jimmykraun@ukr.net

Надійшла 02.09.2020

Прийнята до друку 29.11.2022

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² State Biotechnological University, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

44, Alchevskih str., Kharkiv, Ukraine 61002;
tel.: +380 63 121 78 75
e-mail: jimmykraun@ukr.net

Received 02, September, 2020

Accepted 29, November, 2022

насичені жирні кислоти, які містяться в лікарських і харчових продуктах, дозволяють оптимізувати вуглеводний, жировий, білковий, вітамінний обмін речовин, поліпшити функціональний стан органів і систем організму людини та знизити ризик захворювань. До складу харчових виробів входять ефірні олії, натуральні антиоксиданти, молекулярні комплекси, які мають імуностимулюючу дію, що дозволяє застосовувати їх як інгредієнти лікувально-профілактичних продуктів.

У процесі отримання екстрактів рослинної сировини виникають деякі технологічні проблеми, особливо під час перероблення прянощів з вмістом ліпідних фракцій не більше 5–7% від загальної маси. На сьогодні основними способами перероблення прянощів є пародистиляція та екстракція органічними розчинниками (гексаном, петролейним ефіром, спиртом, ацетоном, перхлоретиленом тощо). Однак існують недоліки використання цих способів. Так, у процесі пародистиляції відбувається часткова або повна деструкція молекулярних термолабільних комплексів, що суттєво знижує їхню біологічну цінність. У свою чергу, відомі органічні розчинники володіють певною хімічною агресивністю, яка призводить до деградації кінцевого продукту. Крім того, виникають складнощі під час видалення таких розчинників із місцели, що призводить до їх підвищеного вмісту в кінцевому продукті. Саме тому на сьогодні для екстракції ліпідних фракцій із сировини рослинного та тваринного походження все частіше використовуються низькотемпературні технології, зокрема зріджені хладони та їх композиції [2, 3]. Ліпідні екстракти, які одержують в умовах низьких температур, зберігають смакові та ароматичні властивості вихідної сировини, нативну структуру та біологічну активність найбільш важливих хімічних речовин. Хладон повністю видаляється з кінцевого продукту завдяки своїй хімічній інертності [4]. Однак технологічні переваги низькотемпературної хладонової екстракції не реалізовані дотепер. Наразі нам невідомі роботи з проведення хладонової екстракції ліпідних фракцій за умов негативних температур. Водночас екстракцію успішно можна проводити за допомогою хладонів з температурою кипіння -30°C і нижче. Результати аналізу показали, що така екстракція особливо ефективна під час переробки ефірно-олійної сировини. У діапазоні температур $0\dots-10^{\circ}\text{C}$ різко падає розчинність у рідких хладонах рослинних парафінів та інших високомолекулярних сполуках. Це дозволяє істотно спростити технологію отримання олій класу

the carbohydrate, fat, protein and vitamin metabolisms, improve the functional state of human organs and systems and reduce the risk of diseases. The fact that the food products include essential oils, natural antioxidants, and molecular complexes with immune stimulatory effect makes it possible to use them as ingredients when creating therapeutic and preventive products.

At the same time, some technological problems arise when obtaining the extracts from plant raw materials, especially when processing spices with a content of lipid fractions below 5–7% of the total weight. Currently, the main ways used for spice processing are the steam distillation and extraction with organic solvents (hexane, petroleum ether, alcohol, acetone, perchlorethylene, *etc.*). However, these techniques have some disadvantages. For example, during steam distillation, a partial or complete destruction of molecular thermolabile complexes occurs, which significantly reduces their biological value. In turn, the known organic solvents have a certain chemical aggressiveness, which leads to finished product degradation. In addition, some difficulties occur when these solvents are removed from the miscella, resulting in their increased content in the finished product. Therefore the low-temperature techniques, in particular liquefied freons and their compositions [2, 5] are more and more used to extract lipid fractions from raw materials of plant and animal origin. The lipid extracts, obtained at low temperatures, keep the odour and taste properties of original raw materials, the native structure and biological activity of the most important chemical substances. The freon is completely removed from the finished product due to its chemical inertness [6]. However, the technological advantages of low-temperature freon extraction have not been implemented so far. In particular, we are not aware of any experiments on freon extraction of lipid fractions at negative temperatures. However, it may be successfully performed using freons with boiling point of -30°C and below. The results of analysis showed this extraction to be especially efficient in processing the essential oil raw materials. Within the temperature range of $0\dots-10^{\circ}\text{C}$, the solubility in liquid freons of vegetable paraffins and other high molecular weight compounds drops sharply. This makes it possible to significantly simplify the extraction technology for absolutes, having an exceptionally strong odour.

The research aim herein was to study in detail the extract composition of lipid fractions from bay leaves, derived by means of low-temperature freon extraction at -5°C .



«абсолют», які характеризуються виключно сильним ароматом.

Мета дослідної роботи — детальне вивчення складу екстрактів ліпідних фракцій лаврового листа, отриманих методом низькотемпературної хладонової екстракції за температури -5°C .

Матеріали та методи

Для одержання олійного екстракту використовували висушене листя лавра благородного (*Laurus nobilis L.*), який росте в Грузії. Лавр благородний — субтропічне дерево або чагарник, усі частини якого містять ефірну олію, дубильні речовини, смоли, гіркоти, які надають йому типового аромату і приємно-гіркого смаку. До складу лаврового листа входять рослинні білки, насичені та ненасичені жирні кислоти, вітамін С, макроелементи (кальцій, магній, калій, фосфор) і мікроелементи (залізо, цинк, мідь, марганець). Вміст ефірної олії в листі досягає 5,5% [6].

У якості екстрагента в дослідженнях було обрано зріджений під тиском хладон R406A (Zhejiang Yonghe Refrigerant Co., Ltd, Китай), який є негорючим, невибухонебезпечним і нетоксичним. Він являє собою ефективну зеотропну суміш трьох добре відомих холодоагентів (хладонів: R22, R142b і R600a у співвідношенні 55:41:4). Температура кипіння за атмосферного тиску становить $32,7^{\circ}\text{C}$. Клас небезпеки хладону R406A — 4. Гранично допустима концентрація в повітрі робочої зони даного хладону складає 3000 mg/m^3 . Серед хладонів, які використовують як екстрагенти, R406A має досить низький показник потенціалу озоноруйнівної здатності — 0,055. Значення для потенціалу глобального потепління у екстрагента R406A становить 1560.

В експериментах використовувалося устаткування для низькотемпературної екстракції ліпідних фракцій зрідженими газами з триступеневою криогенною системою рекуперації, яка була створена Спеціальним конструкторсько-технологічним бюро з дослідним виробництвом при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (рис. 1).

Головною відмінністю цього устаткування від інших у даному технологічному напрямку є наявність триступеневої криогенної системи рекуперації використовуваних хладонових розчинників. При цьому технологічні етапи процесу екстракції ліпідних фракцій реалізуються в такому порядку. Попередньо висушена і подрібнена до розмірів частинок (200 ± 50) мкм сировина завантажується в екстрактор А в спеціальних фільтр-касетах і заливається зрід-

Materials and methods

To obtain an oil extract, we used the dried leaves of the bay laurel (*Laurus nobilis L.*), which grows in Georgia. The bay laurel is a subtropical tree or shrub, all parts of which contain essential oil, tannins, resins, and bitterness, which give them a typical fragrant smell and a pleasant-bitter taste. The bay leaves include vegetable proteins, saturated and unsaturated fatty acids, vitamin C, macroelements (calcium, magnesium, potassium, phosphorus) and microelements (iron, zinc, copper, manganese). The content of essential oil in the leaf reaches 5.5% [1].

As an extracting agent, the non-flammable, non-explosive and non-toxic freon R406A (Zhejiang Yonghe Refrigerant Co., Ltd, China), liquified under pressure, was selected. It is an efficient zeotropic mixture of three well-known refrigerants (freons: R22, R142b and R600a in 55:41:4 ratio). Its boiling point at atmospheric pressure is 32.7°C . The R406A freon refers to 4 hazard class. Its maximum permissible concentration in the air of operation zone is 3000 mg/m^3 . Among the freons used as extracting agents, the R406A has a fairly low ozone-depleting potential (ODP): 0.055. The global warming potential (GWP) of R406A extracting agent is 1560.

Here, we used the equipment for low-temperature extraction of lipid fractions with liquefied gases with a three-stage cryogenic recovery system, designed at the Special Designing and Technology Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Fig. 1).

A key difference between this device and those technologically similar is the presence of a three-stage system of cryogenic recovery for the used freon solvents. Herewith, the technological stages of lipid fraction extraction are implemented in the following order. Pre-dried and crushed up to the size of particles (200 ± 50) μm original raw material is loaded into extractor A in special filter cassettes and filled with liquefied freon from the pressure container C. Temperature and pressure during extraction vary within the ranges of $-10...35^{\circ}\text{C}$ and 1.0...1.5 MPa, respectively. The extraction time is selected experimentally for each type of raw material separately within 0.5...5 hrs. When the extraction is completed, the miscella is poured into the evaporator D and the solvent recovery begins. Herewith, about 80% of evaporating solvent is condensed and discharged into the pressure container C by means of condenser G, on the coil surface of which the temperature within the range of $-15...-20^{\circ}\text{C}$ is provided by refrigerating unit F.



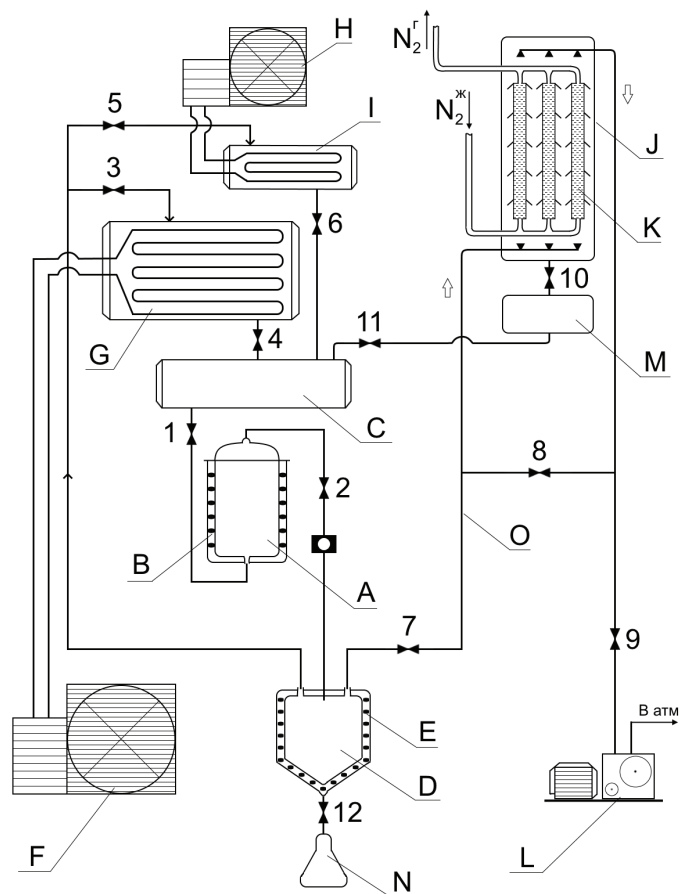


Рис. 1. Схема устаткування для екстракції ліпідних фракцій з біологічної сировини зрідженими хладачами з триступеневою криогенною системою рекуперації розчинників: А — екстрактор, В — нагрівач, С — напірна ємність, D — випаровувач, E — нагрівальні елементи, F — холодильний агрегат, G — конденсатор рекуперації першого ступеня, H — низькотемпературний холодильний агрегат, I — конденсатор другого ступеня рекуперації, J — вакуумний теплообмінник, K — панелі, які охолоджуються рідким азотом (N_2), L — вакуумний насос, M — зливна ємність третього ступеня рекуперації, N — приймальна ємність, O — система трубопроводів, 1–12 — технологічні вентилі.

Fig. 1. Equipment layout for extraction of lipid fractions from biological raw materials using liquefied freons with a three-stage cryogenic system of solvent recovery: A – extractor, B – heater, C – pressure container, D – evaporator, E – heating elements, F – refrigerating unit, G – first-stage condenser, H – low-temperature refrigerating unit, I – second-stage condenser, J – vacuum heat exchanger, K – panels cooled by liquid nitrogen (N_2), L – vacuum pump, M – drain container of third recovery stage, N – receiving container, O – pipeline system, 1–12 – technological valves.

женим хладачем з напірної ємності С. Температура і тиск у процесі екстракції змінюються в діапазонах $-10...35^{\circ}\text{C}$ і $1,0...1,5$ МПа відповідно. Час екстракції підбирається експериментально для кожного виду сировини окремо у межах $0,5...5$ годин. Після закінчення екстракції місцела зливається у випарник D і починається рекуперація розчинника. При цьому близько 80% розчинника, який випаровується, конденсується і зливається в напірну ємність С за допомогою конденсатора G, на поверхні спіралей якого температуру в межах $-15...-20^{\circ}\text{C}$ забезпечує холодильний агрегат F.

У міру того, як конденсується хладачовий розчинник, знижується тиск у контурі рекуперації, що призводить до різкого падіння його

As a freon solvent condenses, the pressure in recovery circuit reduces, resulting in a sharp decrease in its condensation temperature. Thus, when diminishing an excess pressure in the recovery circuit down to the values of $0.15...0.20$ МПа, the condensation temperature of the used R406A solvent is $-10...-15^{\circ}\text{C}$. As a result, the need arises to include the second low-temperature recovery stage with spiral operating temperature in the condenser J within the range of $-45...-50^{\circ}\text{C}$.

To remove the residual freon from the finished product at a pressure in recovery circuit below 0.05 МПа, the third stage of recovery is used, *i. e.* the freon vapors are forcibly removed by vacuum pump L, pass through the vacuum heat exchanger J and settle on panels cooled by liquid nitrogen

температури конденсації. Так, під час зниження надлишкового тиску в контурі рекуперації до значень 0,15...0,20 МПа температура конденсації використовуваного розчинника R406A дорівнює $-10...-15^{\circ}\text{C}$. Це призводить до необхідності включення другого низькотемпературного ступеня рекуперації з робочою температурою спіралей у конденсаторі J в діапазоні $-45...-50^{\circ}\text{C}$.

Для видалення залишкового хладону в кінцевому продукті при тиску в контурі рекуперації нижче 0,05 МПа використовується третій ступінь рекуперації: пари хладону, що примусово видаляються за допомогою вакуумного насоса L, проходять через вакуумний теплообмінник J і осідають на панелях, охолоджуваних зрідженим азотом до -196°C . Така температура необхідна для уловлювання парів хладону, що проходять через теплообмінник зі швидкістю не менше 1 л/с [1]. У результаті цього відбувається повне видалення хладону з кінцевого продукту і мінімізується його втрата в процесі технологічного циклу [3]. Ліпідна фракція, яка залишається в випарнику D після завершення процесу рекуперації розчинника, зливається у приймальну ємність N.

Дослідження якісного складу хладонового екстракту лаврового листа проводилися методом газової хроматографії на хроматографі «Agilent 7890A GC System» з мас-селективним детектором «Agilent 5975C» і блоком введення проби «Agilent 7697A Headspace sampler» (Agilent Technologies, США). Під час досліджень використовували різні підходи введення проби. Проводили аналіз парів зразка та розчину наважки екстракту в дихлорметані. Для одержання парів зразок нагрівали в герметично закритій пробірці, 1 мл парової фази вводили в хроматограф. Для отримання розчину 24 мг екстракту розчиняли в 1 мл дихлорметану, 1 мкл розчину вводили в хроматограф. Для розділення компонентів використовували колонку «HP-5ms», яка входить до комплексу обладнання, діаметром — 0,25 мм, довжиною — 30 м, товщиною нерухомої фази — 0,25 мкм. Температура інжектора — 250°C , розподіл потоку — 10:1. Потік газу на вході в колонку становив 1 мл/хв. Газ-носії — гелій. У дослідженні використовувався температурний градієнт: початкова температура 40°C , нагрівання до 270°C зі швидкістю $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Виявлення проводилося методом мас-спектрометрії. Діапазон сканування мас становив 35–500 m/z (m — маса іона, z — заряд). Отримані результати ідентифікували за допомогою бібліотеки мас-спектрів «NIST-08» (National Institute of Standards and Technology, США). Відбиралися результати з мінімальним індексом подібності 80%. Вміст компонентів хладонового

down to -196°C . This temperature is necessary to capture the freon vapors passing through the heat exchanger at a rate of at least 1 l/s [3]. As a result, freon is completely removed from the finished product and its loss during technological cycle is minimized [5]. The lipid fraction, remaining in the evaporator D after competing solvent recovery, is poured into the receiving container N.

The qualitative composition of bay leaf freon extract was assessed using gas chromatography with Agilent 7890A GC System chromatograph equipped with an Agilent 5975C mass selective detector and an Agilent 7697A Headspace sampler (Agilent Technologies, USA). Different approaches to sample introduction were used during the study. The sample vapors and a solution of extract weighted amount in dichloromethane were analysed. To obtain vapors, the sample was heated in a hermetically sealed test tube, and 1 ml vapor phase was introduced into chromatograph. To obtain a solution, 24 mg of the extract were dissolved in 1 ml of dichloromethane, 1 μl of solution was introduced into chromatograph. The components were separated by means of the HP-5ms column supplied with the equipment, having 0.25 mm diameter, 30 m length, and 0.25 μm thickness of stationary phase. Injector temperature was 250°C , and flow ratio – 10:1. Gas flow at the column inlet was 1 ml/min. Carrier gas was helium. The following temperature gradient such as: initial temperature of 40°C , heating up to 270°C with $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rate was used in this study. Detection was carried out using mass spectrometry. The mass scan range was 35–500 m/z (m is ion mass, and z – charge number of ions). The obtained results were identified using the NIST-08 mass spectral library (National Institute of Standards and Technology, USA). Results with a minimum similarity index of 80% were selected. The content of components of bay leaf freon extract was assessed using internal normalization technique.

A quantitative composition of bay leaf freon extract was analyzed by gas chromatography with Agilent 7890A GC System chromatograph with flame ionization detector. The HP-5 column of 0.32 mm diameter, 30 m length, and 0.25 μm stationary phase thickness was used to separate the components. Injector temperature was 300°C , and flow distribution — 50:1. Gas flow at the column inlet was 1 ml/min. Carrier gas was nitrogen. The initial temperature was 40°C , heating was done up to 270°C with $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rate. The detector temperature was 300°C . Sample processing consisted in preparing the bay leaf extract solution in dichloromethane (24 mg/ml). The sample volume was



екстракту лаврового листа оцінювали методом внутрішньої нормалізації.

Дослідження кількісного складу хладонового екстракту лаврового листа проводилися методом газової хроматографії на хроматографі «Agilent 7890A GC System» з полуменево-іонізаційним детектором. Для розділення компонентів використовували колонку «HP-5» діаметром — 0,32 мм, довжиною — 30 м, товщиною нерухомої фази — 0,25 мкм. Температура інжектора — 300°C, розподіл потоку — 50:1. Потік газу на вході в колонку становив 1 мл/хв. Газ-носії — азот. Початкова температура становила 40°C, нагрівали до 270°C зі швидкістю 5°C/хв. Температура детектора — 300°C. Пробопідготовка — приготування розчину екстракту лаврового листа в ди-хлорметані (24 мг/мл). Об'єм проби — 1 мкл. Для оцінки кількісного вмісту компонентів хладонового екстракту використовували метод внутрішньої нормалізації.

Число аромату хладонового екстракту лаврового листа визначалося йодометричним методом за реакцією взаємодії ефірних олій із хромовою сумішшю, під час якої відбувається їх окиснення. Речовини, що зумовлюють аромат екстракту лаврового листа, відганяли з водяною парою в приймач із хромовою сумішшю. Одержаний дистилат кип'ятили на водяній бані протягом години, після чого його охолоджували, додавали 25 мл 10% розчину калій йодиду та залишали на 3 хв у темряві. Йод, який виділювався, відтитрували 0,2н розчином натрій триоксотіосульфату. Як індикатор використовували 1%-й розчин крохмалю. За результатами титрування розраховували число аромату (в мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100$ г).

Результати та обговорення

Одержаний за допомогою низькотемпературної екстракції зрідженим хладоном R406A екстракт лаврового листа є однорідною в'язкою субстанцією зеленого кольору з добре вираженим смаком і запахом, які властиві лавровому листу.

На рис. 2 представлено графік залежності маси одержаного екстракту від тривалості екстракційного циклу ($t_{\text{екс}}$). Згідно з представленими кривими було одержано до 5% масових часток кінцевого продукту в результаті трьох послідовних циклів по 23 години кожен.

Хроматограми парів і розчину хладонового екстракту лаврового листа наведено на рис. 3, 4.

У результаті проведеного нами дослідження було ідентифіковано 68 компонентів хладонового екстракту лаврового листа (таблиця). На

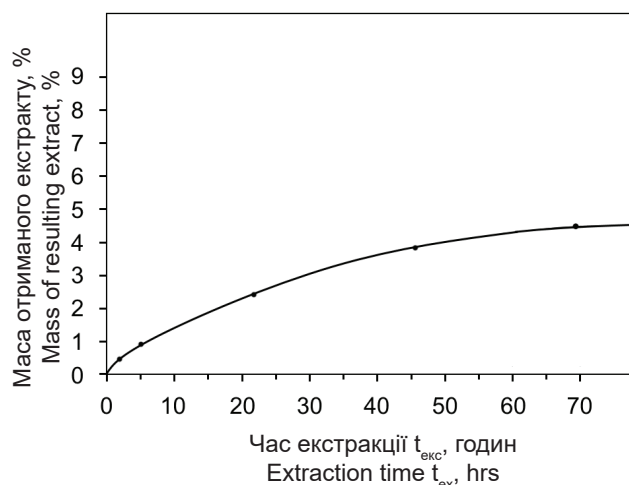


Рис. 2. Залежність маси екстракту від тривалості екстракційного циклу.

Fig. 2. Dependency of the extract mass on duration of extraction cycle.

1 μl . The internal normalization technique was used to estimate a quantitative content of the freon extract components.

The number of odour units of bay leaf freon extract was detected using the iodometric method, based on the reaction of essential oil interaction with chromium mixture, when their oxidation occurred. Substances responsible for the bay leaf extract odour were distilled off with steam in a receiver with a chromium mixture. The resulting distillate was boiled in a water bath for an hour, then cooled, supplemented with 25 ml of 10% potassium iodide solution and left for 3 min in the dark. The released iodine was titrated with 0.2n sodium trioxothiosulfate solution. The 1% starch solution was used as an indicator. Proceeding from the titration results, the number of odour units was calculated (in ml of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100$ g).

Results and discussion

The bay leaf extract, derived by means of low-temperature extraction with liquefied freon R406A, is a homogeneous, viscous substance of green color with a pronounced taste and odour specific to bay leaf.

The Fig. 2 shows a graph of dependency of the obtained extract mass on extraction cycle duration ($t_{\text{екс}}$). According to the presented curves, up to 5% of mass fractions of finished product were obtained as a result of three consecutive cycles of 23 hrs each.

Chromatograms of vapors and solution of bay leaf freon extract are shown in Fig. 3, 4.

This research succeeded to identify 68 components of the bay leaf freon extract (Table). The

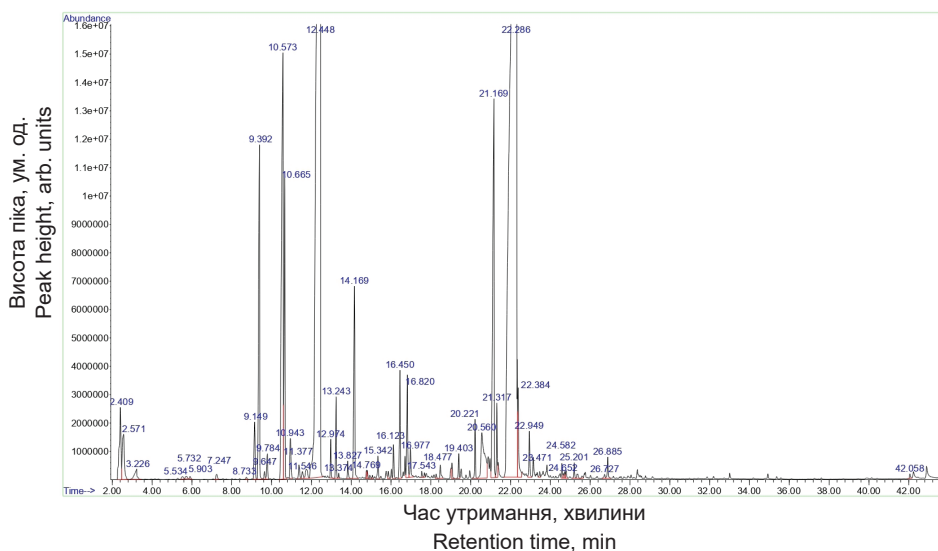


Рис. 3. Хроматограма парів хладонового екстракту лаврового листа.
Fig. 3. Chromatogram of vapors of bay leaf freon extract.

хроматограмі (рис. 4) спостерігаються два дуже інтенсивні піки з часом утримування 12,188 і 21,042 хв, які відповідають 1,8-цинеолу та камфену відповідно. Дані сполуки виявилися домінуючими в досліджуваному зразку.

У результаті проведених досліджень встановлено, що одержаний хладоновий екстракт лаврового листа містив такі класи сполук: терпенові оксиди, монотерпени, жирні кислоти, монотерпеноли, сесквітерпени, феноли, сесквітерпенові лактони, дитерпени, сесквітерпеноли, складні ефіри тощо.

Згідно з отриманими результатами компонентами, вміст яких перевищував 1,5%, були такі речовини: 1,8-цинеол — 27,83%, камфен — 7,65%, сабінен — 4,83%, ліноленова кислота — 3,25%, пальмітинова кислота — 2,38%, 6-етеніл-6-метил-3-метиліден-7-(проп-1-ен-2-іл)гексагідро-1-бензофуран-2(3H)-он — 2,73%, лінолева кислота — 2,30%, α -пінен — 2,09%, β -пінен — 1,89%, неофітадієн — 1,89%, ліналоол — 1,89% і п'ять не ідентифікованих сполук з вмістом 1,60–2,56%.

Під час порівняння якісного складу хладонового екстракту лаврового листа з даними для CO₂-екстракту

chromatogram (Fig. 4) shows two very intense peaks with retention times of 12.188 and 21.042 min, corresponding to 1,8-cineole and camphene, respectively. These compounds occurred to be dominant in the studied sample.

In the research, the obtained bay leaf freon extract was found to contain the following classes of compounds such as: terpene oxides, monoterpenes, fatty acids, monoterpenols, sesquiterpenes, phenols, sesquiterpene lactones, diterpenes, sesquiterpenols, esters, etc.

In accordance with these findings, the components whose content exceeded 1.5% were as follows: 1,8-cineole – 27.83%, camphene – 7.65%, sabinene – 4.83%, linolenic acid – 3.25%, palmitic acid – 2.38%, dehydrosaussurea lactone – 2.73 %, linoleic acid – 2.30%, α -pinene – 2.09%, β -pinene – 1.89%, neophytadiene – 1.89%, linalool – 1.89% and five unidentified compounds with 1.60 – 2.56%.

When comparing a qualitative composition of the bay leaf freon extract with the data for CO₂-extract and the bay leaf extract derived by steam distillation, it was found that 41 compounds were selectively extracted by freon 406A and were

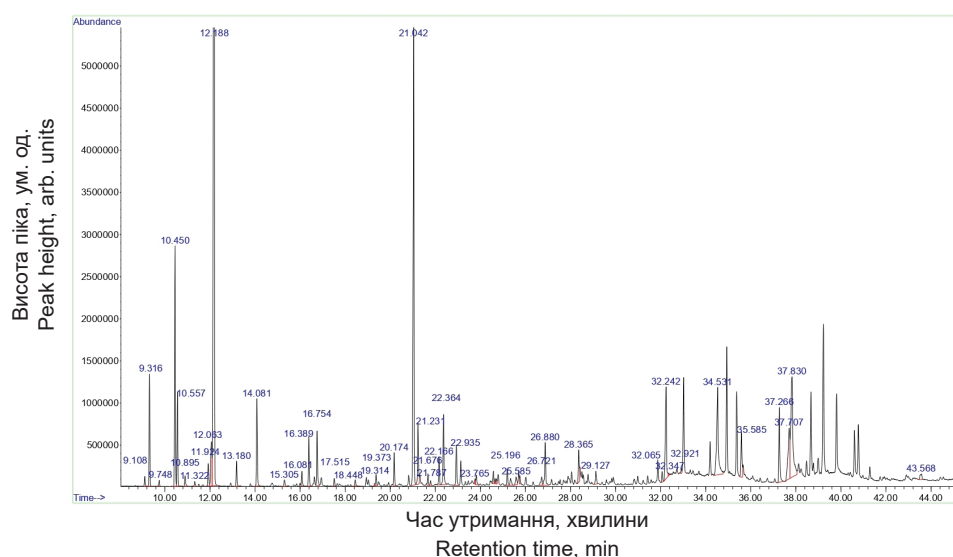


Рис. 4. Хроматограма розчину хладонового екстракту лаврового листа.
Fig. 4. Chromatogram of bay leaf freon extract solution.



Час утримування компонентів хладонового екстракту лаврового листа
Retention time of components of bay leaf freon extract

Компонент Component	Час утримування компонента (хв) під час введення проби Retention time of component (min) during sample introduction in the form of	
	у вигляді парів steam	у вигляді розчину solution
Оцтова кислота Acetic acid	3,225	-
2,3-бутандіол 2,3-Butanediol	5,534	-
Гексаналь Hexanal	5,903	-
3-гексен-1-ол 3-Hexen-1-ol	7,247	-
Дигідро-2(3Н)-фуранон Dihydro-2(3H)-furanone	8,731	-
α -туйєн α -Thujene	9,149	9,108
α -пінен α -Pinene	9,392	9,316
2,4(10)-туйадієн 2,4(10)-Thujadien	9,646	-
Камфен Camphene	9,783	9,748
Сабінен Sabinene	10,573	10,450
β -пінен β -Pinene	10,665	10,557
β -мірцен β -Myrcene	10,942	10,895
α -феландрен α -Phellandrene	11,377	11,324
α -терпінен α -Terpinene	11,755	-
о-цимол o-Cymol	-	11,924
DL-лімонен DL-Limonene	-	12,063
1,8-цинеол 1,8-Cineole	12,448	12,188
5-ізопропіл-2-метилбіцикло[3.1.0.]гексан-2-ол 5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0.]hexan-2-ol	13,243	13,180
Ліналоол оксид Linalool oxide	13,374	-
α -терпінолен α -Terpinolene	13,826	-
(\pm)-ліналоол (\pm)-Linalool	14,169	14,081
Мента-1,4,8-трієн Mentha-1,4,8-triene	14,770	-

Компонент Component	Час утримання компонента (хв) під час введення проби Retention time of component (min) during sample introduction in the form of	
	у вигляді парів steam	у вигляді розчину solution
β -феландрен β -Phellandrene	14,809	-
1-(4-метил-3-циклогексен-1-іл)етанон 1-(4-Methyl-3-cyclohexen-1-yl)ethanone	15,068	-
5-(1-метилетил)-біцикло[3.1.0.]гексан-2-он 5-(1-Methylethyl)- bicyclo[3.1.0.]hexan-2-one	15,866	-
Терпін-4-ол Terpine-4-ol	16,450	16,389
α -терпінєол α -Terpineol	16,821	16,754
Метилхавікол Methyl chavico	16,977	-
γ -терпінєн γ -Terpinene	12,974 17,543	17,515
S-(+)-карвон S-(+)-Carvone	18,264	-
δ -3-карен δ -3-Carene	11,547 18,478	18,448
4-туйєн-2- α -іл ацетат 4-Thujen-2- α -yl acetate	19,060	19,033
Борнілацетат Bornyl acetate	19,404	19,373
1-метилєн-4-(1-метилєтеніл)-циклогексан 1-Methylene-4-(1-methyl ethenyl)-cyclohexane	20,222	20,174
Триацетин Triacetin	20,560	-
Камфєн Camphene	21,168	21,042
Євгєнол Eugenol	21,316	21,231
α -улангєн α -Ylangene	-	21,676
α -копаєн α -Copaene	-	21,791
β -єлемен β -Elemene	-	22,166
Тетрадекан Tetradecane	22,302	-
Метилєвгєнол Methyleugenol	22,384	22,364
β -каріофілен β -Caryophyllene	22,950	22,935
3,7-гуаядієн 3,7-Guaiadiene	23,470	-
1,5,9,9-тетрамєтил-1,4,7-циклоундекатрієн 1,5,9,9-Tetramethyl-1,4,7-cycloundecatriene	-	23,769



Компонент Component	Час утримування компонента (хв) під час введення проби Retention time of component (min) during sample introduction in the form of	
	у вигляді парів steam	у вигляді розчину solution
β -гвайєн β -Guaiene	-	23,823
β -селінен β -Selinene	24,581	24,574
цис-метилізоєвгенол cis-Methyl isoeugenol	24,652	-
Ізогомогенол Isohomogenol	-	24,650
Валенсен Valencene	24,726	24,718
α -селінен α -Selinene	24,794	24,790
γ -кадінен γ -Cadinene	25,200	25,196
γ -муролен γ -Murolene	25,342	25,338
Копаєн Copaene	25,593	25,585
α -бісаболєн α -Bisabolene	25,757	25,753
Спатуленол Spathulenol	26,726	26,721
каріофілен оксид Caryophyllene oxide	26,885	26,880
β -евдєсмол β -Eudesmol	28,369	28,365
Неофітадієн Neophytadiene	-	32,065
6-етеніл-6-метил-3-метилідєн-7-(проп-1-ен-2-іл)гексагідро-1-бензофуран-2(3H)-он Dehydrosaussurea lactone	-	32,242 32,348
Костунолід Costunolide	-	32,921
Пальмітинова кислота Palmitic acid	-	34,531
Ванілосмін Eremanthin	-	35,584
Неофітадієн Neophytadiene	-	37,266
Лінолева кислота Linoleic acid	-	37,707
Ліноленова кислота Linolenic acid	-	37,829
Біс(2-етилгексил)єфір адипінової кислоти Bis(2-ethylhexyl)ester hexanedioic acid	42,058	-
Октадекан Octadecane	-	43,571

та одержаного паровою дистиляцією екстракту лаврового листа встановлено, що 41 сполука селективно екстрагувалася хладоном R406A і зовсім була відсутня в інших екстрактах. В усіх зразках було визначено 10 компонентів: 1,8-цинеол, ліналоол, терпінен-4-ол, 4-туйен-2- α -іл ацетат, борнілацетат, евгенол, метилевгенол, β -каріофілен, спатуленол, каріофілен оксид. Істотною відмінністю було те, що в хладоновому екстракті одна з домінуючих сполук — камфен, а в інших екстрактах — α -терпеніл ацетат. Крім того, в хладоновому екстракті виявлено значну кількість пальмітинової, лінолевої та ліноленої кислот. В інших екстрактах дані кислоти були відсутні [7].

Таким чином, за низькотемпературної екстракції хладоном R406A здатний вилучати широкий спектр неполярних речовин (монотерпенів, сесквітерпенів, терпеноїдів, жирних кислот) з лаврового листа.

Наявність у хладоновому екстракті лаврового листа 1,8-цинеолу, ліналоолу, бета-мірцену, лимонену, α - та β -піненів, камфену, δ -3-карену, сабінену, γ -кадінену, α -терпінеола, евгенолу визначає аромат продукту. Однією з кількісних характеристик вмісту речовин, які обумовлюють аромат сировини і харчових продуктів, є число аромату. У результаті проведеного аналізу встановлено, що число аромату для хладонового екстракту лаврового листа складає (1122 ± 20) мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100$ г.

Згідно з даними Р.Ю. Павлюка та співавт. [5] число аромату для водно-спиртового екстракту за позитивних температур і наноекстракту з лаврового листа однакове та становить 234,8 мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100$ г. Таким чином, використання низькотемпературної хладонової екстракції дозволяє одержати продукт, для якого вміст ароматичних речовин більше в 4,8 рази, порівняно з застосуванням методів екстракції за позитивних температур. Використання хладонового екстракту лаврового листа навіть у невеликих кількостях у якості домішок у виробництві харчових продуктів дозволить додатково надати їм аромату, покращити безпечність і технологічність його застосування.

Висновки

Методом низькотемпературної екстракції зрідженим газом (хладоном R406A) виділено екстракт ліпідних фракцій лаврового листа. Встановлено, що вихід кінцевого продукту дорівнює до 5% масових часток.

Методом газової хроматографії з наступною мас-спектрометрією досліджено якісний склад

absolutely absent in other extracts. In all the specimens, there were identified 10 components such as: 1,8-cineole, linalool, terpinen-4-ol, 4-thujen-2- α -yl acetate, bornyl acetate, eugenol, methyleugenol, β -caryophyllene, spatulenol, Caryophyllene oxide. The fact that camphene was among the dominant compounds in freon extract, while α -terpenyl acetate was in the others, distinguished them to a great extent. Furthermore, a significant amount of palmitic, linoleic and linolenic acids was found in freon extract. These acids were absent in the other extracts [4].

Thus, during low-temperature extraction, the freon R406A is able to extract a wide range of non-polar substances (monoterpenes, sesquiterpenes, terpenoids, fatty acids) from bay leaves.

The presence of 1,8-cineole, linalool, β -myrcene, limonene, α - and β -pinene, camphene, δ -3-carene, sabinene, γ -cadinene, α -terpineol, and eugenol in the bay leaf freon extract determines the product odour. The number of odour units is one of the quantitative characteristics of the content of substances, determining the odour of raw materials and food products. The performed analysis found the number of odour units for the bay leaf freon extract to be $1,122 \pm 20\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100$ g.

As reported by Pavlyuk R.Yu. *et al.* [7], the number of odour units for water-alcohol extract at positive temperatures and nanoextract from bay leaf is equal and makes 234.8 ml of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100$ g. Thus, the use of low-temperature freon extraction enables obtaining a product for which the content of aromatic substances is 4.8 times higher, compared to extraction methods at positive temperatures. The use of bay leaf freon extract even in small amount as additives in food production will provide them an additional aroma, improve the safety and manufacturability of its use.

Conclusions

Using the technique of low-temperature extraction with liquefied gas (freon R406A), an extract of lipid fractions from bay leaf was derived. The finished product yield was found to be up to 5% mass fractions.

Gas chromatography followed by mass spectrometry were used to analyze a qualitative composition of bay leaf freon extract. There were identified 68 components. The study of the extract's quantitative composition by gas chromatography using a flame ionization detector showed 1,8-cineole and camphene to be the dominant compounds. Significant amounts of palmitic, linoleic and linolenic acids were revealed.



хладонового екстракту лаврового листа. Ідентифіковано 68 компонентів. Дослідження кількісного складу екстракту методом газової хроматографії з використанням полуменево-іонізаційного детектора показало, що домінуючими сполуками є 1,8-цинеол та камфен. Визначено наявність значних кількостей пальмітинової, лінолевої та ліноленової кислот.

Встановлено, що отриманий за низьких температур хладоновий екстракт лаврового листа характеризується великим вмістом ароматоутворювальних речовин. Число аромату хладонового екстракту склало (1122 ± 20) мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100$ г, що дозволяє рекомендувати його в якості ароматичної домішки у виробництві харчових продуктів.

Література

1. Гольцев АМ, Осецький ОІ, Кравченко МА, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Установа для екстракції ліпідних фракцій зрідженими газами. Патент України 59166U. 10.05.2011.
2. Дем'яненко ДВ, Бреусова СВ. Вивчення складу дифторометанового екстракту, одержаного при комплексній переробці суцвіть липи. Вісник фармації. 2012; 3(71): 43–7.
3. Михайлов ВМ, Тімошенко ЮП, Чуйко ЛО. Удосконалення технології екстрагування рослинної сировини зрідженим газом (фреон R-134a). Восточно-Европейский журнал передовых технологий. Технологии и оборудование пищевых производств 2015; (6): 29–32.
4. Осецкий АИ, Грищенко ВИ, Гольцев АН, и др. Криогенные технологии в производстве фармацевтических, косметических, агротехнических препаратов и биологически активных пищевых добавок. Проблемы кробиологии. 2009; (4): 488–99.
5. Павлюк РЮ, Погарська ВВ, Радченко ВО, та ін. Розробка технології наноекстрактів та нанопорошків із прянощів для оздоровчих продуктів. Восточно-Европейский журнал передовых технологий. Технологии и оборудование пищевых производств 2015; (3): 54–9.
6. Al-Hashimi A, Mahmood S. The nutritional value and antioxidant activity of bay leaves (*Laurusnobilis* L). Bas J Vet Res. 2016; 2(15): 246–59.
7. Ivanovic J, Mistic D, Ristic M, et al. Supercritical Carbon dioxide extract and essential oil of bay (*Laurus nobilis* L.)-Chemical composition and antibacterial activity. J Serbian Chem Soc. 2010; 75(3): 395–404.

The bay leaf freon extract derived at low temperatures was established to have a high content of aroma-forming substances. The odour units of freon extract were $(1,122 \pm 20)$ ml of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100$ g, that enabled to recommend it as aromatic admixture in food production.

References

1. Al-Hashimi A, Mahmood S. The nutritional value and antioxidant activity of bay leaves (*Laurusnobilis* L). Bas J Vet Res. 2016; 2(15): 246–59.
2. Demianenko DV, Breusova SV. [Study of composition of difluoro-methane extract derived by complex processing of linden inflorescences]. Visnyk farmatsii 2012; 3(71): 43–7. Ukrainian.
3. Goltsev AM, Osetskyi OI, Kravchenko MA, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, assignee. [Installation for extraction of lipid fractions by liquefied gases]. Ukraine patent UA 59166U. May 10, 2011. Ukrainian.
4. Ivanovic J, Mistic D, Ristic M, Pesic O, Zizovic I. Supercritical carbon dioxide extract and essential oil of bay (*Laurus nobilis* L.) – chemical composition and antibacterial activity. J Serbian Chem Soc. 2010; 75(3): 395-404.
5. Mikhaylov V, Timoshenko Yu, Chuiko L, et al. [A liquefied gas (Freon R-134a) in an improved technology of extracting plant materials]. Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. Technology and equipment of food production. 2015; (6): 29-32. Ukrainian
6. Osetsky AI, Grischenko VI, Goltsev AN, et al. Cryogenic technologies in the production of pharmaceutical, cosmetic, agrotechnical preparations and biologically active food additives. Problems of Cryobiology. 2009; (4): 488–99.
7. Pavlyuk RYu, Pogarska VV, Radchenko VO, et al. [Development of technology of nanoextracts and nanopowders from spices for health products]. Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. Technology and equipment of food production. 2015; (3): 54–9. Ukrainian.