

PRIDOBIVANJE IN VREDNOTENJE RASTLINSKIH IZVLEČKOV

PRODUCTION AND EVALUATION OF HERBAL EXTRACTS

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: nina.kocevar.glavac@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Pot od rastline do rastlinskega izvlečka se začne z rastlinsko drogo, ki je po splošni definiciji sveža ali posušena cela rastlina, njen del (npr. list, cvet ali korenina) ali izloček (npr. oleorezin, gumi ali smola). Med rastlinske droge v širšem pomenu uvrščamo tudi eterična olja in sokove. Rastlinske droge uporabljamo v njihovi izvorni obliki, iz njih izoliramo učinkovine ali pa iz njih izdelamo izvlečke (ekstrakte). V farmaciji rastlinske droge v izvorni obliki najbolj poznamo kot zdravilne čaje. Za izolacijo spojin se navadno odločimo pri rastlinskih drogah z močnimi učinki, majhno vsebnostjo učinkovin ali ko sinteza učinkovin, ki jih vsebujejo, ni mogoča. Še številnejši pa so razlogi za izdelavo izvlečkov: odstranitev toksičnih in neaktivnih sestavin, povečanje sta-

POVZETEK

Rastlinski izvlečki so zmesi večjega števila (bioaktivnih) spojin. Tako izvorna rastlinska droga kot postopek izdelave, vključno z načinom ekstrakcije, vrsto ekstrakcijskega topila in razmerjem med drogo in topilom, pomembno vplivajo na sestavo izvlečka. Slednja je ključna za zeleno biološko aktivnost. Članek predstavlja načine pridobivanja in vrednotenja rastlinskih izvlečkov, ki so izhodišče za razumevanje problematike vrednotenja izdelkov z rastlinskimi izvlečki.

KLJUČNE BESEDE:

analiza, rastlinski izvlečki, pridobivanje, vrednotenje, zdravilne rastline

ABSTRACT

Herbal extracts are complex mixtures of (bioactive) compounds. The initial herbal substance as well as the production procedure, including the extraction process, extraction solvent and the ratio between the herbal substance and the solvent, have an important impact on the extract composition which is crucial for the desired biological activity. The article presents methods for extract production and evaluation which are a basis for understanding the issues of evaluating products with herbal extracts.

KEY WORDS:

analysis, herbal extracts, medicinal plants, production, evaluation

bilnosti bioaktivnih spojin, zmanjšanje volumna ter izboljšanje videza, vonja in okusa. Posebej moramo poudariti prednost z vidika delovanja: izvlečki so zmesi številnih spojin, ki lahko delujejo sinergistično ter zmanjšajo ali preprečijo neželene učinke posameznih spojin. Hkrati pa se kompleksnost njihove sestave odraža v problematiki vrednotenja rastlinskih izvlečkov (1, 2).

Kakovostna rastlinska droga in postopek izdelave sta ključna dejavnika za kakovosten rastlinski izvleček. Na stopnji pridobivanja na sestavo izvlečka bistveno vplivajo temperatura, ekstrakcijsko topilo in razmerje med drogo in topilom. Pomemben podatek je razmerje med drogo in končnim izvlečkom ali *drug to extract ratio* (DER); npr. DER 10 : 1 pomeni, da smo iz 10 kg listov oljke izdelali 1 kg izvlečka (3, 4). V splošnem moramo v postopku izdelave



zagotoviti odsotnost nečistot, ki lahko izvirajo iz izhodnega materiala (npr. pesticidi, težke kovine in mikroorganizmi) ali proizvodnega procesa (npr. mikroorganizmi in organska topila), in jih preverjati v končnem izdelku ter vrednotiti kakovost izvlečkov z vidika vsebnosti učinkovin oz. bioaktivnih spojin, pri čemer imamo na voljo številne analizne metode (2). Izraz učinkovine se nanaša na aktivne spojine v zdravilih, medtem ko je izraz bioaktivne spojine splošen in pomeni spojine, ki izražajo biološke učinke.

Pri izdelavi rastlinskih izvlečkov farmacevtske kakovosti morajo proizvajalci upoštevati in natančno opredeliti vse zgoraj izpostavljene dejavnike (3, 4). Na področjih prehranskih dopolnil oz. živil in kozmetičnih izdelkov pa zahteve niso tako stroge, zato se v stroki soočamo s težavami, kako določen izdelek prepoznati kot kakovosten (predvsem z vidika biološke aktivnosti). V članku smo se osredotočili na glavne načine pridobivanja in vrednotenja rastlinskih izvlečkov, ki lahko služijo kot dobro izhodišče za razumevanje problematike vrednotenja izdelkov z rastlinskimi izvlečki.

2 VRSTE RASTLINSKIH IZVLEČKOV

Po krovni definiciji Formularium Slovenicum oz. Evropske farmakopeje so rastlinski izvlečki ali ekstrakti tekoči (tekoči izvlečki in tinkture), poltrdni (gosti izvlečki) in trdni (suhi izvlečki) pripravki iz navadno posušenih rastlinskih drog (5, 6). Z vidika sestave oz. biološke aktivnosti sta od navedene razdelitve glede na konsistenco izvlečkov še pomembnejši razdelitev glede na način pridobivanja (npr. vodni, vodno-alkoholni, alkoholni, organski izvlečki, oljni (trigliceridni) izvlečki in izvlečki, pridobljeni s superkritičnimi tekočinami) ter glede na vsebnost učinkovin oz. bioaktivnih spojin (standardizirani, kvantificirani in drugi izvlečki). Definicije navajamo spodaj (1, 2, 5, 6, 7).

- *Tekoči izvlečki* so vodni ali vodno-etanolni izvlečki z DER 1 : 1. Izdelamo jih z ekstrakcijo rastlinskega materiala ali z raztapljanjem gostih in suhih izvlečkov.
- *Tinkture* so tekoči izvlečki z DER 1 : 5 ali 1 : 10. Izdelamo jih z maceracijo, perkolacijo ali z raztapljanjem gostih in suhih izvlečkov. Topilo je navadno 70-odstotni (V/V) etanol. Predpis lahko zahteva tudi uporabo drugega topila in drugačno razmerje med rastlinsko drogo in topilom.
- *Gosti izvlečki* so poltrdni izvlečki, ki jih izdelamo z odparevanjem večjega deleža topila.

- *Suhi izvlečki* so trdni izvlečki, ki jih izdelamo s popolnim odparevanjem topila (vsebnost vode ne presega 5 %).
- Pri *standardiziranih izvlečkih* poznamo bioaktivne spojine in njihovo vsebnost uravnamo na določeno vrednost, pri čemer izvlečkom dodamo pomožne snovi ali mešamo različne serije izvlečkov.
- Pri *kvantificiranih izvlečkih* poznamo le nekatere bioaktivne spojine in njihovo vsebnost (ali vsebnost markerjev) uravnamo na določeno območje, pri čemer mešamo različne serije izvlečkov.
- *Drugi izvlečki* so izvlečki, katerih bioaktivnih spojin ne poznamo in jih izdelamo po določenem postopku, pri čemer definiramo npr. ekstrakcijsko topilo in razmerje med rastlinsko drogo in topilom. Posameznim serijam ne smemo dodajati pomožnih snovi ali jih mešati.

Rastlinske droge in topila, ki jih uporabljamo za izdelavo rastlinskih izvlečkov farmacevtske kakovosti, morajo ustrezati zahtevam farmakopejskih monografij.

3 PRIDOBIVANJE RASTLINSKIH IZVLEČKOV

Kvalitativna in kvantitativna sestava rastlinskih izvlečkov sta, ob kakovostni rastlinski drogi, najbolj odvisni od izbire ustrezne metode pridobivanja (ekstrakcije). Glavni dejavniki, ki vplivajo na uspešnost slednje, so: vrsta rastlinskega materiala (npr. posušenost, razdrobljenost in rastlinski del), kemizem učinkovin, ekstrakcijsko topilo, temperatura in čas.

3.1 IZBIRA EKSTRAKCIJSKEGA TOPILA

Pri izbiri topila je zaželeno, da čim bolj sledimo naslednjim kriterijem za idealno ekstrakcijsko topilo: selektivnost, inertnost, hlapnost, netoksičnost in cenovna dostopnost. Ustrezna stopnja selektivnosti, hlapnost in inertnost zagotavljajo uspešnost ekstrakcije s tehnološkega vidika, z vidika varnosti pa velja opozoriti na pomen izbire takšnega topila, ki v minimalnih, a tehnološko neizogibnih količinah ne predstavlja nevarnosti za človekovo zdravje. Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta 2009/32/ES (8) navaja seznam ekstrakcijskih topil za uporabo pri proizvodnji živil in njihovih sestavin, od katerih uporabljamo brez omejitev etanol, acetat, etilacetat, propan, butan, ogljikov dioksid in dušikov oksid; topila s posebej določenimi nameni uporabe in mejnimi vrednostmi ostankov so metanol, metilacetat, etilmetilketon, dimetileter, heksan in diklorometan.

Preglednica 1: Ekstrakcijska topila in v njih topne rastlinske bioaktivne spojine (1, 2, 10).

Table 1: Extraction solvents and therein extractable herbal bioactive compounds (1, 2, 10).

Voda	Metanol	Etanol	Aceton	Dietileter	Trigliceridi	Diklorometan
antocianini	antocianini	alkaloidi	flavonoidi	alkaloidi	fitosteroli	antranoidi
flavonoidi	flavonoidi	flavonoidi	trigliceridi	kumarini	karotenoidi	
polisaharidi	saponini	poliacetileni		maščobne kisline	terpeni/terpenoidi	
saponini	tanini	steroli		terpenoidi	vitamini (lipofilni)	
tanini	terpenoidi	tanini				
terpenoidi		terpenoidi				
vitamini (hidrofilni)						

Največ uporabljano in hkrati tudi topilo izbora je etanol ali zmes etanola in vode; sledijo metanol in metanolno-vodne raztopine. Z dodatkom vode dosežemo nabrekanje rastlinskega materiala in povečamo poroznost celičnih sten, kar pospeši difuzijo spojin v topilo. V splošnem upoštevamo priporočilo, da pri ekstrakciji trdih rastlinskih drog, kot so korenine, lubje, les in semena, uporabimo 70- ali 80-odstotni etanol, pri ekstrakciji listov in nadzemnih delov pa 50-odstotni etanol (9). Splošen seznam najpogostejših topil za ekstrakcijo bioaktivnih spojin iz rastlinskih drog podajamo v preglednici 1 (1, 2, 10).

3.2 METODE EKSTRAKCIJE

H klasičnim metodam ekstrakcije prištevamo npr. maceracijo, perkolacijo in Soxhletovo ekstrakcijo. V širšem smislu med ekstrakcije uvrščamo tudi destilacijo. Zadnjih nekaj desetletij znanstveniki intenzivno raziskujejo in razvijajo izboljšave teh metod in alternativne metode, pri čemer sta njihovi glavni vodili boljša okoljska sprejemljivost zaradi manjše porabe klasičnih oz. toksičnih organskih topil ter večja učinkovitost zaradi krajšega časa izvedbe, boljše selektivnosti in večjega izkoristka. Nove metode temeljijo npr. na uporabi ultrazvoka, mikrovalov, pulzirajočega električnega polja, encimov in superkritičnih tekočin (11), pri čemer so si nekatere že utrle pot do industrijske uporabe. V nadaljevanju opisujemo najpomembnejše metode ekstrakcije. Posamezni koraki njihove izvedbe so okvirni in se lahko razlikujejo, odvisno od literaturnih virov oz. proizvajalca.

Maceracija

Maceracija velja za enega enostavnejših in najpogosteje uporabljenih postopkov pridobivanja rastlinskih izvlečkov.

Zdrobljeno rastlinsko drogo zmešamo s topilom v razmerju 1 : 5 ali 1 : 10, če ni drugače predpisano, pustimo na sobni temperaturi, pri čemer maceracijsko zmes občasno pretresemo ali premešamo ter po nekaj dnevih odcedimo ali filtriramo. Postopek ponovimo dva- do trikrat s svežim topilom. Na koncu preostanek rastlinskega materiala dobro stisnemo. Maceracija na industrijski ravni pogosto poteka z nekaj modifikacijami: povišana temperatura, konstantno mešanje in/ali krajši čas. Glavni slabosti metode sta dolgotrajnost postopka in zaostanek učinkovine oz. bioaktivne spojine v rastlinski drogi (9, 11). Maceracijo uporabljamo npr. za pridobivanje tinktur in oljnih izvlečkov.

V to skupino izvlečkov lahko uvrstimo tudi poparke (infuze) in prevretke (dekokte), ki jih pripravljamo z vodo, a bistveno krajši čas kot klasične macerate: celo ali zdrobljeno rastlinsko drogo prelijemo z vrelo vodo za 5 do 15 minut (poparek) oziroma zdrobljeno rastlinsko drogo prelijemo s hladno vodo, segrevamo do vrenja in nato vremo 15 to 30 minut (prevretek) (12).

Perkolacija

Pri perkolaciji uporabljamo posebno napravo, perkolator, ki je valjasta aparatura iz stekla ali kovinskega materiala, s sitastim filtrom na spodnjem, zoženem koncu. Zdrobljeno rastlinsko drogo naložimo v perkolator, jo navlažimo s topilom, perkolator nato napolnimo s topilom in maceriramo več ur. Nato odpremo ventil in začnemo dovajati sveže topilo. Postopek končamo po odvzemu približno petih perkolatov. Glavna prednost perkolacije je boljši izkoristek v primerjavi z maceracijo, glavna slabost pa velika poraba topil (9, 13). Perkolacijo najpogosteje uporabljamo za pridobivanje tinktur.



Destilacija

Najpogosteje uporabljena destilacijska metoda je vodna destilacija. Svežo ali posušeno rastlinsko drogo vremo v vodi ali skozi spuščamo vodno paro, hlapne spojine in paro pa nato ohlajamo. Produkta destilacije sta vodna (hidrolat) in oljna faza (eterično olje), ki se ločita zaradi razlike v gostoti in topnosti. Eterična olja so večinoma lažja od vode in so v njej težko topna, zato plavajo na njeni površini (1, 11).

Ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami

Najpogosteje uporabljamo CO₂, ki je inerten, nevnetljiv in netoksičen. CO₂ v superkritičnem stanju (kritična temperatura 31,1 °C in kritični tlak 73,8 bar) ima zelo majhno viskoznost in je močno difuzen, zato velja za boljše ekstrakcijsko topilo v primerjavi s klasičnimi tekočinami. Primeren je za ekstrakcijo nepolarnih snovi (npr. trigliceridov, hlapnih snovi in karotenoidov), za ekstrakcijo polarnih snovi pa mu dodamo sotopila (npr. etanol ali metanol). Ekstrakcija poteka pri nizki temperaturi (do -20 °C) in visokem tlaku (do 200 bar), pri čemer topilo stalno teče skozi rastlinsko drogo. S spreminjanjem temperature in tlaka ekstrakcijo selektivno usmerjamo in ekstrahiramo npr. bolj hidrofilne ali lipofilne snovi. Glavna prednost je odsotnost zaostanka topil, pri znižanju tlaka preidejo v plinasto stanje, slabost pa (trenutno še) visoka cena proizvodnje (1, 14).

4 VREDNOTENJE RASTLINSKIH IZVLEČKOV

4.1 ANALIZNE METODE

Pri fitokemijski karakterizaciji (tj. kvalitativno in kvantitativno ovrednotenje učinkovin oz. bioaktivnih spojin ali markerjev) rastlinskih izvlečkov najpogosteje uporabljamo barvne reakcije ter spektroskopske in kromatografske (npr. TLC, HPLC in GC) metode; slednje na kratko opisujemo v nadaljevanju. Kromatografske metode temeljijo na različnem porazdeljevanju analitov med stacionarno in mobilno fazo, zaradi česar se ločijo, nato pa jih detektiramo oz. vizualiziramo. Omeniti velja, da je v zadnjih dveh desetletjih kromatografska analitika izjemno napredovala (izboljšanje občutljivosti, podatki o strukturnih lastnostih analitov), predvsem z razvojem sklopljenih metod, ki temeljijo na združitvi tekočinske (LC) ali plinske (GC) kromatografije in masne spektroskopije (MS), kot sta npr. GC-MS in LC-MS.

Vrednotenje z analiznimi metodami je pomembno tako z vidika neposredne kontrole kakovosti, npr. med pridobivanjem rastlinskih izvlečkov, kot tudi odkrivanja neželenih situacij, kot je napačen, neustrezen ali ponarejen material (15).

Tankoplastna kromatografija (TLC)

V fitokemijski analizi je bila TLC v preteklosti metoda izbora in še danes predstavlja osnovo (farmakopejskega) vrednotenja številnih rastlinskih izvlečkov. Praktična izvedba obsega nanos vzorca na stekleno ploščico (trdna stacionarna faza silikagela), ki jo položimo v kadičko s tekočo mobilno fazo (zmes topil) ter pustimo določen čas. Identifikacija spojin navadno poteka z uporabo orositvenih reagentov ali UV svetlobe, in sicer kot primerjava s standardi, pri čemer za polkvantitativno vrednotenje vizualno primerjamo položaj, velikost in intenzivnost lis. Metodo lahko izvajamo tudi v avtomatizirani obliki (nanos vzorcev, računalniško vrednotenje), kar izboljša kakovost analiznih rezultatov (16). TLC je primerna za vrednotenje kemijsko zelo raznolikih snovi: terpenov in terpenoidov (sestavine eteričnih olj), alkaloidov, fenolnih spojin itd.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Največ uporabljamo reverznofazno HPLC, ki temelji na nepolarni trdni stacionarni fazi in polarni tekoči mobilni fazi, pri čemer je princip ločevanja enak kot pri TLC, vendar mobilna faza teče skozi kolono pod visokim tlakom, uporabljamo lahko tudi povišano temperaturo. Injiciranje vzorca je avtomatizirano, prav tako detekcija (navadno UV-VIS ali fluorescentna). Analiza zahteva uporabo standardnih referenčnih spojin (16). Metoda je tako kot TLC primerna za analizo zelo širokega nabora snovi, njena velika prednost pa je bistveno večja občutljivost.

Plinska kromatografija z masno spektroskopijo (GC-MS)

GC-MS je sklopljena analizna metoda: s plinsko kromatografijo dosežemo ločitev spojin v vzorcu, z masno spektrometrijo pa jih kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo. Analiti vstopijo v kolono s pomočjo injektorja in se ločujejo med trdno stacionarno fazo in plinsko mobilno fazo pri visoki temperaturi (navadno do 250 °C). Po prehodu kolone spojine vstopijo v masni spektrometer, kjer v vakuumu ionizirajo (pomembno je razmerje med maso in nabojem ionov). Kot rezultat analize dobimo masni spekter, ki ga primerjamo z referenčnim masnim spektrom iz knjižnice podatkov (16). GC-MS uporabljamo za analizo hlapnih

spojin ali v hlapne derivate pretvorjenih spojin in je predvsem pomembna npr. za eterična olja, maščobnokislinsko sestavo trigliceridov itd.

4.2 PRIMERJAVA RASTLINSKIH IZVLEČKOV

Strokovni delavci v lekarnah in specializiranih prodajalnah ter tudi širše (v drogerijah in živilskih trgovinah) se danes soočajo z izjemno velikim številom izdelkov iz rastlinskih izvlečkov, ki so na tržišču kot zdravila, prehranska dopolnila, kozmetični izdelki ali navadna živila. Izziv, kako prepoznati kakovostne izdelke, je včasih nemogoče premostiti, saj proizvajalci in dobavitelji na specifikacijah teh izdelkov pogosto ne podajajo vseh potrebnih podatkov, na podlagi katerih bi jih lahko ovrednotili (kadar ne gre za rastlinske izvlečke farmacevtske kakovosti).

Kot povzetek v članku podanih informacij o pridobivanju in vrednotenju rastlinskih izvlečkov naj izpostavimo naslednje podatke, ki opredeljujejo izvlečke in so ključnega pomena pri vrednotenju njihove kakovosti:

- identifikacija rastline in rastlinske droge: botanična vrsta, podvrsta, sorta, rastlinski del,
- vrsta izvlečka,
- vsebnost izvlečka,
- vsebnost bioaktivnih spojin oz. markerjev,
- ekstrakcija: metoda in postopek ekstrakcije, ekstrakcijsko topilo, razmerje med ekstrakcijskim topilom in izvlečkom (DER),
- vrsta in vsebnost pomožnih snovi.

Pri vrednotenju izvlečkov predstavljajo veliko dodano vrednost analizi certifikati in proizvodne specifikacije. Služijo nam lahko tudi kot potrditev strokovnega pristopa proizvajalca oz. dobavitelja ter kot orodje za pridobivanje podrobnejših podatkov. Hkrati se moramo zavedati, da niti popoln nabor proizvodnih in analiznih podatkov pogosto ne omogoča celovitega vpogleda v kakovost oz. pričakovano biološko aktivnost nekega rastlinskega izvlečka. Vidika biološke aktivnosti namreč ne določata izključno kompleksnost in definiranost njegove sestave, temveč tudi razpoložljivost podatkov na ravni raziskav rastlinskih primarnih in sekundarnih metabolitov ter kot najbolj zanesljivo merilo – razpoložljivost podatkov o klinično dokazani učinkovitosti. Naj poudarimo, da moramo te podatke predložiti v postopku pridobitve dovoljenja za promet z zdravilom rastlinskega izvora. Zato je smiselno priporočilo, da naj bo zdravilo rastlinskega izvora primarno vodilo pri izbiri ali svetovanju pacientom.

5 SKLEP

Kakovostna rastlinska droga in ustrezen postopek izdelave sta ključna dejavnika za kakovosten rastlinski izvleček. Izdelava rastlinskih izvlečkov farmacevtske kakovosti je zakonodajno definirana, na področjih prehranskih dopolnil, živil in kozmetičnih izdelkov pa prepoznavamo ohlapnost kriterijev tako na ravni proizvodnje kot analize. Zato je smiselno, da stremimo k izbiri izdelkov z rastlinskimi izvlečki, ki so zdravila rastlinskega izvora, oz. da za izdelek z rastlinskimi izvlečki pridobimo čim več proizvodnih in analiznih podatkov.

6 LITERATURA

1. Janeš D, Kočevar Glavač N. *Sodobna kozmetika, Sestavine naravnega izvora*. 1st ed. Ljubljana: Širimo dobro besedo; 2015.
2. Kreft S, Kočevar Glavač N. *Sodobna fitoterapija, Z dokazi podprta uporaba zdravninskih rastlin*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2013.
3. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. *Guideline on quality of herbal medicinal products1/traditional herbal medicinal products*. 31 March 2011.
4. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. *Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations1 in herbal medicinal products2/traditional herbal medicinal products*. 11 March 2010.
5. Vučko Mole S (ur). *Formularium Slovenicum, Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji s šestim dopolnilom 2004*. Zavod za farmacijo in preizkušanje zdravil, 2004.
6. Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. *European Pharmacopoeia 7.0, 01/2011, Volume 1*. Strasbourg: Council of Europe; 2010.
7. Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. *European Pharmacopoeia 9.0, 01/2017, Volume I*. Strasbourg: Council of Europe; 2016.
8. European Commission. *Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients (Recast) (Text with EEA relevance) [Internet]*. Brussels: European Commission; 2009 [cited 2018 Aug 17]. Available from: <http://data.europa.eu/eli/dir/2009/32/2010-09-16>
9. Samuelsson G, Bohlin L. *Drugs of Natural Origin, A Treatise of Pharmacognosy*. 6th ed. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press; 2010. 69-73 p.
10. Cowan MM. *Plant products as antimicrobial agents*. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Oct;12(4):564-82.



11. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 2013 Aug; 117(4):426-36.
12. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. Glossary on herbal teas. EMA/HMPC/5829/2010 Rev.1. 15 July 2010.
13. Azwanida NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants.* 2015 Jul;4(3):196.
14. Lang Q, Wai CM. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review. *Talanta.* 2001 Jan;53(4):771-82.
15. Kamboj A. Analytical Evaluation of Herbal Drugs. In: Vallisuta O, editor. *Drug Discovery Research in Pharmacognosy* [Internet]. London: IntechOpen; 2012 [cited 2018 Aug 17]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/drug-discovery-research-in-pharmacognosy/analytical-evaluation-of-herbaldrugs>
16. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis.* 6th ed. Thomson Brooks/Cole; 2007.