



پیشرفت‌های اخیر در زمینه روش‌های استخراج ترکیب‌های گیاهی بهزاد ذوالفقاری^۱، افسانه یکدانه^۲

۱. استاد گروه فارماکوتکنوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان؛

۲. دستیار فارماکوتکنوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (yekdaneh@pharm.mui.ac.ir)

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۸/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۲۷

نوع مقاله: کوتاه - مروری

موضوع: شیمی گیاهی - فرآوری

چکیده

مقدمه و هدف: فن‌آوری‌های جدید و مختلفی شامل عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت، عصاره‌گیری همراه با امواج مایکروویو و عصاره‌گیری همراه با مایع فوق بحرانی به منظور استخراج ترکیبات از گیاهان گسترش یافته‌اند. این فن‌آوری‌ها به منظور کاهش دادن مدت زمان عصاره‌گیری، کاهش میزان حلال مصرفی، افزایش بازده استخراج و تقویت کیفیت عصاره حاصله گسترش یافته‌اند. در این مقاله به معرفی و مقایسه روش سوکسله و روش‌های جایگزین و نوین مورد استفاده در داروسازی پرداخته شده است. برای به‌دست آوردن بهترین و موثرترین عصاره، توجه به مواردی از جمله خصوصیات ماده گیاهی، انتخاب حلال مناسب و دقت در مراحل عصاره‌گیری ضروری بوده و باید در نظر داشت که بازده بالا در عصاره حاصله به معنای بازده بالای ترکیب مورد نظر در عصاره نمی‌باشد.
توصیه کاربردی: در روش عصاره‌گیری با استفاده از امواج فراصوت نفوذ حلال به بافت گیاهی به خوبی صورت می‌گیرد و در مقایسه با سایر روش‌ها این روش از کارآیی و سرعت بالاتری برخوردار است.

کلید واژگان:

- ✓ مایکروویو
- ✓ امواج فراصوت
- ✓ مایع فوق بحرانی
- ✓ سوکسله

۱. مقدمه

همراه با مایع فوق بحرانی (Lang & Marr & Games, 2000; Wai, 2001; Meireles & Angela, 2003) برای استخراج ترکیب‌های از گیاهان بسیار سریع و موثر عمل می‌کنند. این روش‌های جدید، پیشرفت زیادی داشته‌اند و برخی موارد استفاده از آن‌ها در استخراج مواد گیاهی گزارش شده‌اند.

۲. متن مقاله

۲-۱. روش سوکسله

- اصول و مکانیسم

روش‌های کلاسیک عصاره‌گیری بر پایه قرارگرفتن گیاه در حلال مناسب می‌باشد که به منظور افزایش سرعت فرآیند از هم زدن یا حرارت دادن استفاده می‌شود. از جمله روش‌های کلاسیک می‌توان سوکسله، تقطیر، خیساندن و پرکولاسیون را نام برد. روش سوکسله یک روش استاندارد است که به عنوان مرجع اصلی ارزیابی دیگر روش‌ها به کار

گیاهان دارویی حاوی ترکیبات ثانویه وسیعی هستند که اغلب دارای فعالیت زیستی مهمی هستند و از آنجایی که عصاره‌های گیاهی به طور وسیعی در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، فن‌آوری‌های عصاره‌گیری مورد ارزیابی قرار گرفته تا بتوانند این ترکیبات فعال را از منابع گیاهی استخراج نمایند. روش‌های سنتی مانند روش سوکسله که سال‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است، بسیار زمان‌بر بوده و مقدار زیادی حلال مصرف می‌کند (Luque de Castro & Garcia- Ayuso, 1998). به همین دلیل تقاضای زیادی برای روش‌های عصاره‌گیری جدیدی با زمان کوتاه‌تر، میزان مصرف حلال کمتر و محافظ محیط زیست وجود دارد. روش‌های جدید عصاره‌گیری مانند عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت (Vinatoru, 2001)، عصاره‌گیری همراه با امواج مایکروویو (Kaufmann & Christen, 2002) و عصاره‌گیری

۲-۲. روش عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت^۱

- اصول و مکانیسم

در این روش امواج فراصوت با فرکانس بالاتر از ۲۰ کیلو هرتز، به داخل ماده نفوذ کرده، موجب ایجاد کشیدگی و جمع شدن‌های پی‌درپی شده که در نتیجه آن حفراتی داخل ماده گیاهی ایجاد می‌شوند. این حفرات به صورت نامتقارن به هم پیوسته و موجب خروج سریع مواد از داخل سلول‌ها به خارج از آن می‌شوند. به علاوه این امواج می‌توانند موجب تخریب دیواره سلول‌های زیستی شده و موجب تسهیل خروج مواد گردند (Luque-Garcia & Luque de Castro, 2003)

- نکات مهم در روش عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت

در این روش محتوای رطوبت ماده گیاهی اهمیت فراوانی دارد زیرا حداکثر قدرت امواج در مجاورت منبع تولید موج بوده و با افزایش فاصله از منبع، قدرت امواج کاهش می‌یابد به علاوه هرچه ماده موجود در مسیر تابش جامد و متراکم تر باشد، میزان کاهش امواج بیشتر خواهد بود، بنابراین با به کار بردن ماده گیاهی مرطوب از کاهش قدرت امواج جلوگیری می‌شود (Romdhane et al., 1995)

کاهش اندازه ذره‌ای در این روش هم موجب افزایش بازده می‌گردد. فرکانس امواج می‌تواند در بازده تاثیرگذار باشد به طوری که در استخراج پیرترین‌ها از پیرتروم افزایش کوچکی در فرکانس منجر به افزایش ۲۲٪ در بازده شده است، اما در عصاره‌گیری از گیاه افزایش فرکانس تاثیر قابل توجهی بر بازده نداشته است (Salisova et al., 1997).

دمای عصاره‌گیری در این روش باید مد نظر قرار گرفته شود و از افزایش بی‌بهره دما جلوگیری گردد. طول مدت عصاره‌گیری هم در این روش اهمیت خاصی داشته و افزایش بیش از حد آن موجب تغییر در کیفیت عصاره حاصله خواهد شد.

- محاسن روش عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت

این روش ارزان، ساده و موثر بوده و افزایش بازده عصاره‌گیری و افزایش سرعت واکنش از مهم‌ترین محاسن آن به شمار می‌رود، به طوری که در استخراج ساپونین‌ها از جین سینگ با استفاده از این روش نسبت به روش‌های کلاسیک بازده ۳۰٪ و سرعت ۳ برابر افزایش می‌یابد (Hui et al., 1994).

در این روش دمای کمتری برای عصاره‌گیری لازم است در نتیجه به ترکیبات حساس به حرارت، کمتر آسیب می‌رسد. در مقایسه این روش با سایر روش‌های جدید عصاره‌گیری، این روش آسان‌تر و ارزان‌تر بوده، با هر نوع حلالی نیز قابل انجام می‌باشد.

می‌رود. این روش، عمومی بوده که به طور عمده برای استخراج ترکیبات با فرایت کم یا متوسط که در مقابل حرارت پایدار باشند به کار می‌رود (Luque de Castro & Garcia-Ayuso, 1998).

- نکات مهم در روش سوکسله

در این روش و سایر روش‌های عصاره‌گیری انتخاب حلال اهمیت بسیار زیادی دارد، به طوری که انتخاب حلال‌های مختلف موجب ایجاد عصاره‌های متفاوت و ترکیبات متنوع در آن عصاره خواهد شد (Zarnowski & Suzuki, 2004).

در این روش هگزان، حلالی است که مورد استفاده قرار می‌گیرد زیرا دمای جوش بین ۶۳ تا ۶۹ درجه سانتی‌گراد داشته، حلالیت مواد روغنی در آن خوب است و می‌توان پس از استفاده آن را بازیافت کرد، اما این حلال آلاینده محیط زیست بوده و به همین دلیل گاهی از حلال‌های کم‌خطری مانند اتانول، ایزوپروپانول، هیدروکربن‌ها و غیره در این روش استفاده می‌شود (Mamidipally & Liu, 2004).

اندازه ذره‌ای از موارد دیگری است که در این روش و هر روش عصاره‌گیری دیگری اهمیت داشته و با کاهش آن میزان نفوذ حلال به داخل ماده گیاهی افزایش یافته و بازده افزایش می‌یابد، به طوری که در استخراج روغن‌ها از دانه‌های روغنی برای دست‌یابی به بازده ۹۹٪ با اندازه ذره‌ای ۰/۴ میلی‌متر حدود ۲ ساعت و با اندازه ذره‌ای ۲ میلی‌متر ۱۲ ساعت زمان لازم است (Luque- Garcia & Luque de Gastro, 2004).

دما از موضوع‌های دیگری است که در همه روش‌ها از جمله سوکسله باید به آن توجه کرد.

- محاسن روش سوکسله

محاسن این روش عبارت است از (Li et al., 2004):

- ۱- روش ساده و آسان است.
- ۲- حلال تازه به‌طور مداوم در تماس با پودر گیاهی قرار می‌گیرد.
- ۳- استفاده از دمای بالا که منجر به افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در دمای پایین می‌شود.
- ۴- بعد از استفاده از این روش فیلتراسیون لازم نیست.

- معایب روش سوکسله

مهم‌ترین معایب این روش عبارت است (Luque de Castro & Garcia - Ayuso, 1998):

- ۱- این روش زمان زیادی لازم دارد.
- ۲- مقدار زیادی حلال مصرف می‌شود.
- ۳- به علت استفاده از دمای بالا به ترکیبات حساس به حرارت آسیب می‌رسد و مواد ناخواسته و نامطلوبی ایجاد شوند.

¹ - Ultrasonic – assisted extraction

افزایش می‌دهد. استخراج آرتیمیزیین از آرتیمیزیا با استفاده از این روش نسبت به روش سوکسله نه تنها زمان عصاره‌گیری را از چند ساعت به ۱۲ ثانیه کاهش داده است، بلکه بازده را از ۶۰٪ به ۹۲/۱٪ افزایش داده است. به علاوه ۴-۵ دقیقه عصاره‌گیری با روش مایکروویو بازده بالاتری را نسبت به ۲۰-۲۴ ساعت عصاره‌گیری در دمای اتاق ایجاد می‌کند (Hao et al., 2002).

کاهش میزان حلال مصرفی از محاسن دیگر این روش است و گاهی با استفاده از این روش میزان حلال مورد نیاز تا ۲۰ برابر کاهش می‌یابد. سادگی و هزینه نسبتاً پایین هم از دیگر محاسن این روش می‌باشد.

- معایب روش عصاره‌گیری همراه با امواج مایکروویو

در این روش گرمای ایجاد شده می‌تواند به ترکیبات حساس به حرارت آسیب برساند. به علاوه این روش به هر حال برای استخراج ترکیبات با قطبیت پایین مناسب نیست و فیلتراسیون انتهایی مورد نیاز بعد از استفاده از این روش از دیگر معایب آن محسوب می‌شود.

۴-۲. روش عصاره‌گیری همراه با مایع فوق بحرانی

- اصول و مکانیسم

مایع فوق بحرانی ماده‌ای است که در دماها و فشارهای بالاتر از نقطه بحرانی قرار گرفته، در این شرایط ماده به صورت گاز یا مایع نیست بلکه حد واسط این دو حالت بوده، به طوری که از لحاظ خصوصیات نفوذپذیری مانند گازها و از لحاظ قدرت انحلال مواد مانند مایعات می‌باشد. حلالیت مواد در این فاز با تغییر دانسیته که خود تحت کنترل دما و فشار است تغییر می‌کند و بعد از نفوذ ماده مورد نظر به داخل فاز، در انتهای عصاره‌گیری می‌توان با تغییر دما و فشار فاز فوق بحرانی را به صورت گاز خارج کرده و عصاره را بدون حلال به دست آورد (Sihvonon et al., 1999).

- نکات مهم در روش عصاره‌گیری همراه با مایع فوق بحرانی

در این روش انتخاب حلال اهمیت بسیاری دارد. از دی اکسید کربن به دلیل قیمت پایین، سمیت و قابلیت اشتعال کم و شرایط بحرانی مطلوب (دمای ۳۰۴ درجه کلوین و فشار ۷/۳ مگاپاسکال) برای استخراج ترکیبات غیر قطبی مثل هیدروکربن‌ها استفاده می‌شود (Vilegas et al., 1997). برای استخراج ترکیبات قطبی از حلال‌هایی مانند فرتون ۲۲ و نیتروس اکساید استفاده می‌شود، اما حلال‌های ذکر شده از جمله آلاینده‌های خطرناک محیط زیست می‌باشند (Lang & Wai, 2001). به همین دلیل از تعدیل کننده‌هایی مانند متانول به منظور افزایش قطبیت کربن دی اکساید استفاده می‌گردد. متانول تا حدود ۲۰٪ با کربن دی اکساید قابل اختلاط بوده، قابلیت حل مواد قطبی را داراست اما باعث افزایش شرایط بحرانی کربن دی اکساید شده و سمی است. از اتانول هم می‌توان استفاده کرد ولی این حلال هم

- معایب روش عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت

پس از عصاره‌گیری با این روش، فیلتراسیون و جدا کردن عصاره حاصله از ماده گیاهی نیاز است. اگر چه می‌توان با به کار بردن حلال‌های اختصاصی تا حدودی روش را انتخابی کرد اما به هر حال چون در این روش سلول گیاهی پاره شده و کلیه محتویات سلولی در تماس با حلال قرار می‌گیرند، این روش به طور کلی غیر انتخابی تلقی می‌شود.

۳-۲. روش عصاره‌گیری همراه با امواج مایکروویو

- اصول و مکانیسم

امواج مایکروویو، امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۰/۳ تا ۳۰۰ گیگا هرتز هستند. این امواج به داخل بافت گیاهی نفوذ کرده و با مولکول‌های قطبی مانند آب واکنش داده و گرما ایجاد می‌کنند. در واقع مولکول‌های قطبی مثل آب این امواج را جذب کرده، موجب ایجاد گرمای زیاد داخلی در ماده گیاهی و در نتیجه تخریب سلول‌ها می‌گردند (Kaufmann et al., 2001).

- نکات مهم در روش عصاره‌گیری همراه با امواج مایکروویو

دما و اندازه ذره‌ای در این روش هم‌مانند روش‌های قبلی ذکر شده اهمیت زیادی دارد. به علاوه در این روش هم، محتوای رطوبت ماده گیاهی بسیار مهم است. زیرا همان‌طور که ذکر شد حلال‌های قطبی و به ویژه آب توانایی جذب امواج را خواهند داشت. بنابراین هر چه محتوای رطوبت ماده بیشتر باشد، میزان جذب امواج بیشتر و گرمای بیشتری ایجاد می‌شود و در نتیجه آن تخریب سلول‌ها هم افزایش می‌یابد. انتخاب حلال مناسب در این روش هم به قدرت حلالیت و هم به ثابت دی الکتریک حلال بستگی دارد به طوری که در استخراج پیگمان‌های رنگی پاپریکا از ۳۰ حلال مختلف استفاده کرده‌اند و دریافته‌اند که اگر از حلال‌های قطبی مثل اتانول، متانول و آب استفاده شود به علت داشتن ثابت دی الکتریک بالا مطلوب بوده اما قادر به حل پیگمان‌های رنگی نیستند و عکس این موضوع را در مورد حلال‌های غیر قطبی مثل هگزان و تولوئن خواهیم داشت (Csiktusndi Kiss et al., 2000).

به‌همین دلیل معمولاً از مخلوط حلال‌ها برای افزایش قدرت حلالیت و قطبیت همراه با هم استفاده می‌شود. به‌علاوه به‌منظور افزایش قطبیت حلال‌هایی مانند هگزان، گزین و تولوئن به آن‌ها آب اضافه می‌شود (Spar Eskilsson & Bjorklund, 2000).

- محاسن روش عصاره‌گیری همراه با امواج مایکروویو

کاهش طول زمان عصاره‌گیری از مهم‌ترین محاسن این روش است، به طوری که در استخراج ساپونین‌ها از جین سینگ با استفاده از این روش زمان عصاره‌گیری از ۱۲ ساعت به چند دقیقه کاهش یافته است (Kwon et al., 2003). این روش بازده عصاره‌گیری را هم

زمان عصاره‌گیری را کاهش می‌دهد اما در افزایش بازده موثر نبوده است (Coelho *et al.*, 2003).

- محاسن روش عصاره‌گیری همراه با مایع فوق بحرانی
قدرت حلالیت مایع فوق بحرانی تحت تأثیر دما و فشار تغییر یافته، احتمال استخراج ترکیبات خاص را فراهم می‌کند و در پایان کار حلال به راحتی قابل بازیابی می‌باشد. به دلیل استفاده از حلال‌های ایمن در این روش، از آلودگی محیط پیش‌گیری می‌شود، افزایش بازده و کیفیت روغن‌های فرار و مواد معطر از دیگر محاسن این روش می‌باشند.

- معایب روش عصاره‌گیری با مایع فوق بحرانی
در این روش استفاده از فشارهای زیاد مستلزم مصرف هزینه‌های بالا بوده و به علاوه این روش به هر حال برای استخراج مواد با قطبیت بالا دارای محدودیت می‌باشد.

شرایط بحرانی کربن دی‌اکساید را افزایش می‌دهد (Hamburger *et al.*, 2004).

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود حلال‌هایی مانند متان و اتان اگر چه شرایط بحرانی پایینی دارند ولی به علت ایجاد سمیت کبدی استفاده نمی‌شوند و حلال‌هایی مانند اتیلن هم قابلیت واکنش پذیری بالایی داشته و ممکن است به برخی ترکیبات آسیب برسانند.

محتوای رطوبت ماده گیاهی در این روش هم اهمیت دارد زیرا آب موجود در گیاه به شکل یخ درآمده و سدی فیزیکی در برابر عبور مایع فوق بحرانی فراهم می‌کند، به علاوه یخ تا حدودی در فاز فوق بحرانی وارد شده و موجب انحلال ترکیبات ناخواسته می‌گردد (Chemat *et al.*, 2004). اندازه ذره‌ای بر خلاف سایر روش‌ها تأثیر چندانی در بازده نداشته و عصاره‌گیری از رازیانه با اندازه ذره‌ای ۰/۳۰ و ۰/۵۵ و ۰/۷۵ میلی‌متر، بازده را تغییر نداده است (Coelho *et al.*, 2003). افزایش سرعت جریان دی‌اکسید کربن فقط

جدول ۱. مقایسه شرایط بحرانی حلال‌های مختلف

محلول	وزن مولکولی	دمای بحرانی	فشار بخار بحرانی	چگالی بحرانی
	g mol ⁻¹	K	MPa (atmosphere)	g cm ⁻³
دی‌اکسید کربن (CO ₂)	۴۴/۰۱	۳۰۴/۱	۷/۳۸ (۷۲/۸)	۰/۴۷
آب (H ₂ O) (acc. IAPWS)	۱۸/۰۲	۶۴۷/۰۹	۲۲/۰۶ (۲۱۷/۸)	۰/۳۲
متان (CH ₄)	۱۶/۰۴	۱۹۰/۴	۴/۶۰ (۴۵/۴)	۰/۱۶
اتان (C ₂ H ₆)	۳۰/۰۷	۳۰۵/۳	۴/۸۷ (۴۸/۱)	۰/۱۲
پروپان (C ₃ H ₈)	۴۴/۰۹	۳۶۹/۸	۴/۲۵ (۴۱/۹)	۰/۲۲
اتیلن (C ₂ H ₄)	۲۸/۰۵	۲۸۲/۴	۵/۰۴ (۴۹/۷)	۰/۲۲
پروپیلین (C ₃ H ₆)	۴۲/۰۸	۳۶۴/۹	۴/۶۰ (۴۵/۴)	۰/۲۲
متانول (CH ₃ OH)	۳۲/۰۴	۵۱۲/۶	۸/۰۹ (۷۹/۸)	۰/۲۷
اتانول (C ₂ H ₅ OH)	۴۶/۰۷	۵۱۳/۹	۶/۱۴ (۶۰/۶)	۰/۲۸
استون (C ₃ H ₆ O)	۵۸/۰۸	۵۰۸/۱	۴/۷ (۴۶/۴)	۰/۲۸

۳. نتیجه‌گیری

بوده اما هنگام استفاده از این روش باید در نظر داشت که حداکثر قدرت امواج در مجاورت منبع تولید موج است.

۴. منابع

Chemat, S., Lagha, A., Aitamar, H., Bartels, P. V., & Chemat, F. 2004. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 188-195.

برای به‌دست آوردن بهترین و موثرترین عصاره، توجه به مواردی از جمله خصوصیات ماده گیاهی، انتخاب حلال مناسب و دقت در مراحل عصاره‌گیری ضروری بوده و باید در نظر داشت که بازده بالا در عصاره حاصله به معنای بازده بالای ترکیب مورد نظر در عصاره نمی‌باشد. به طور خلاصه تخریب موثر بافت گیاهی و نفوذ حلال به داخل آن از خصوصیات روش عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت

- Luque-Garcia, J. L. & Luque de Castro, M. D. 2004. Ultrasound-assisted soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment-Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034: 237-242.
- Luque-Garcia, J. L., & Luque de Castro, M. D. 2003. Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 41-47.
- Mamidipally, P. K. & Liu, S. X. 2004. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 122-125.
- Marr, R. & Gamse, T. 2000. Use of supercritical fluids for different processes including new developments - A review. *Chemical Engineering and Processing*, 39: 19-28.
- Meireles, A. & Angela, M. 2003. Supercritical extraction from solid: Process design data 2001-2003. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7: 321-330.
- Romdhane, M., Gourdon, C. & Casamatta, G. 1995. Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. *Ultrasonics*, 33: 221-227.
- Salisova, M., Toma, S. & Mason, T. J. 1997. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4: 131-134.
- Sihvonen, M., Jarvenpaa, E., Hietaniemi, V., & Huopalahti, R. 1999. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 217-222.
- Spar Eskillsson, S., & Bjorklund, E. 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902: 227-250.
- Vilegas, J. H. Y., de Marchi, E. & Lancas, F. M. 1997. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('Guaco') leaves. *Phytochemical Analysis*, 8: 266-270.
- Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303-313.
- Zarnowski, R. & Suzuki, Y. 2004. Expedient soxhlet extraction of ferulic acid from wheat grains. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 649-664.
- Coelho, J. A. P., Pereira, A. P., Mendes, R. L. & Palavra, A. M. F. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of *Foeniculum vulgare* volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 316-319.
- Csiklusnadi Kiss, G. A., Forgacs, E. F., Cserhati, T., Mota, T., Morais, H. & Ramos, A. 2000. Optimization of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annuum* L.) powders. *Journal of Chromatography A*, 889: 41-49.
- Hamburger, M., Baumann, D. & Adler, S. 2004. Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants-Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis*, 15: 46-54.
- Hao, J. Y., Han, W., Huang, S. D., Xue, B. Y. & Deng, X. 2002. Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 28: 191-196.
- Hui, L., Etsuzo, O. & Masao, I. 1994. Effects of ultrasound on the extraction of saponin from ginseng. *Japanese Journal of Applied Physics*, 33(5B): 3085-3087.
- Kaufmann, B., & Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction *Phytochemical Analysis*, 13: 105-113.
- Kaufmann, B., Christen, P., & Veuthey, J. L. 2001. Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. *Phytochemical Analysis*, 12: 327-331.
- Kwon, J. H., Belanger, J. M. R., Jocelyn Pare, J. R. & Yaylayan, V. A. 2003. Application of microwave-assisted process (MAP TM) to the fast extraction of Ginseng saponins. *Food Research International*, 36: 491-498.
- Lang, Q. & Wai, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. *Talanta*, 53: 771-782.
- Lang, Q., & Wai, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. *Talanta*, 53: 771-782.
- Li, H., Pordesimo, L. & Weiss, J. 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37: 731-738.
- Luque de Castro, M. D. & Garcia-Ayuso, L. E. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytical Chemical Acta*, 369: 1-10.

