

# EKSTRAKCIJA S SUBKRITIČNO VODO ZA PRIDOBIVANJE RASTLINSKIH EKSTRAKTOV SUBCRITICAL WATER EXTRACTION FOR THE PRODUCTION OF PLANT EXTRACTS

AVTORICI / AUTHORS:

asist. Katja Schoss, mag. ind. farm.  
izr. prof. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: katja.schoss@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Ekstrakcija s subkritičnimi tekočinami je med sodobnimi, okolju prijaznimi tehnologijami ekstrakcije pritegnila veliko pozornosti zaradi njihovih edinstvenih lastnosti, ki omogočajo različne možnosti uporabe. Uporaba subkritične vode

## POVZETEK

Zmanjšana poraba energije, učinkovita pretvorba reaktantov v produkte, manj stranskih odpadkov, možnost vpetosti v krožno gospodarstvo ter večja kakovost in varnost končnih izdelkov so ključne zahteve pri razvoju novih tehnologij in tehnologija s subkritičnimi tekočinami po optimizaciji ekstrakcijske metode v splošnem ustreza vsem naštetim kriterijem. Pogosto uporabljano topilo je voda, saj je okolju prijazna, lahko dostopna in ekonomsko opravičljiva. Subkritična voda ima v primerjavi z vodo pri normalnih pogojih posebne lastnosti, kot so manjša gostota, manjša dielektrična konstanta, večja ionizacijska konstanta in nižja površinska napetost. V članku predstavljamo proces ekstrakcije s subkritično vodo ter možnosti njene uporabe za pridobivanje rastlinskih izvlečkov.

## KLJUČNE BESEDE:

ekstrakcija, rastlinski izvlečki, subkritična voda

## ABSTRACT

Reduced energy consumption, efficient conversion of reactants into products, less by-products and higher quality and safety of finished products are key requirements in the development of new technologies, and subcritical fluid technology generally meets all these conditions after optimisation of the method. A frequently used solvent is water, as it is environmentally friendly, easily accessible and economically justifiable. Subcritical water has specific properties compared to water under normal conditions, such as lower density, lower dielectric constant, higher ionization constant and lower surface stress. In the article, we present the process of extraction with subcritical water and the possibilities of its use in the production of plant extracts.

## KEY WORDS:

extraction, plant extracts subcritical water

je še posebej zanimiva, ker je voda kot topilo netoksična, nevnetljiva in dostopna (1, 2). V nadaljevanju bomo predstavili lastnosti subkritične vode, postopek, prednosti in slabosti ekstrakcije s subkritično vodo ter primere uporabe te tehnologije za pridobivanje rastlinskih izvlečkov, ki nakazujejo obetavne možnosti tudi za farmacevtsko, kozmetično in prehransko industrijo.



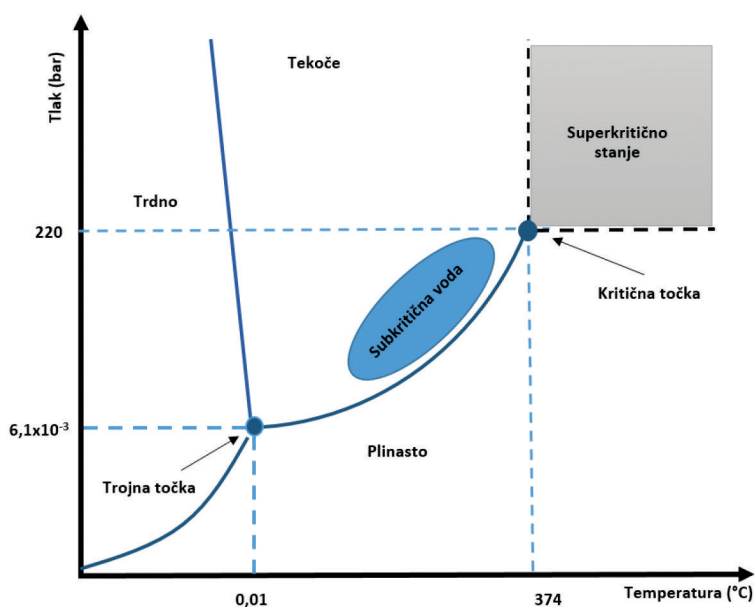
## 2 LASTNOSTI SUBKRITIČNE VODE

Subkritična voda je učinkovito topilo, katalizator in reaktant za hidrolizne pretvorbe in ekstrakcije. Ekstrakcija poteka pri temperaturah med 100 in 374 °C in pri tlaku v območju do 220 bar, da vodo vzdržuje v tekočem stanju (slika 1). Pri temperaturi nad 374 °C in tlaku nad 220 barov pa voda preide v superkritično stanje. Lastnosti vode pri normalnih pogojih ter v subkritičnem in superkritičnem stanju so predstavljene v preglednici 1 (3, 4, 5).

S spremembo temperature ekstrakcije in tlaka se spremenijo lastnosti vode kot ekstrakcijskega topila. Voda je polarno topilo z dielektrično konstanto ( $\epsilon$ ) 78,5 pri normalnih pogojih. Odgovorna je za dobro topnost in ekstrakcijo polarnih spojin

pri sobnih pogojih. Pri temperaturi med 100 in 374 °C (pod dovolj visokim pritiskom, da voda ostane v tekočem stanju) pa se dielektrična konstanta vode močno zniža in posledično voda postane primerna za ekstrakcijo tako polarnih kot nepolarnih spojin. Na primer, v subkritičnem stanju se dielektrična konstanta vode zmanjša na približno 33 pri temperaturi 200 °C (15 bar). Ta vrednost je primerljiva dielektrični konstanti nekaterih organskih topil, na primer metanola ( $\epsilon = 32,6$ ; normalni pogoji), ki ga pogosto uporabljamo za ekstrakcijo spojin zmerne polarosti. Pri temperaturi 250 °C znaša dielektrična konstanta vode 27, z nadaljnjim višanjem temperature na 300 °C pa pade na 20 (3, 4).

Z doseganjem nižje polarosti pri povišanih temperaturah lahko tehnologija ekstrakcije s subkritično vodo ustvari visoke izplete ekstrakcije in hiter čas ekstrakcije številnih hidrofolbnih organskih snovi (npr. eteričnih olj, maščobnih kislin in karotenoidov) (3).



Slika 1: Fazni diagram vode z označenim predelom, kjer je voda v subkritičnem stanju; povzeto po viru (36).

Figure 1: Water phase diagram with a marked area, where water is in subcritical state; adapted from (39).

Preglednica 1: Lastnosti vode pri različnih pogojih (3).

Table 1: Water properties under different conditions (3).

Lastnost	Voda pri normalnih pogojih	Voda blizu kritičnega stanja	Superkritična voda
Temperatura (°C)	25	350	400
Tlak (bar)	1	250	500
Gostota (kgm <sup>-3</sup> )	997,45	625,45	577,79
Dielektrična konstanta ( $\epsilon$ )	78,5	14,86	12,16
Disociacijska konstanta ( $\epsilon$ )	14,0	11,5	11,5

Pri povišenih temperaturah v subkritičnem stanju se poleg polarnosti znatno zmanjšajo tudi gostota vode (preglednica 1), površinska napetost in viskoznost. Zmanjšanje površinske napetosti omogoča povečano omočenje ekstrakcijskega materiala z vodo in hitrejše raztapljanje ciljnih spojin. Zmanjšana viskoznost vode poveča njeno prodiranje (difuzijo) v ekstrakcijski material, kar prav tako pospeši ekstrakcijo (3).

Z višanjem temperature pa se pojavijo tudi oksidacijske lastnosti vode. Najmočnejše so prav ob prehodu v superkritično stanje, kar lahko povzroči kemijske spremembe snovi, ki se lahko odrazijo v zmanjšani topnosti (npr. fenolov) (3).

Poleg omenjenih lastnosti se spreminjajo tudi ionizacijske lastnosti vode glede na temperaturo. Disociacijska konstanta ( $K_w$ ) vode se poveča od  $1,0 \times 10^{-14}$  pri  $25\text{ }^\circ\text{C}$  do  $1,2 \times 10^{-12}$  pri  $350\text{ }^\circ\text{C}$ . To pomeni, da se pH spremeni s približno 7,0 na 5,5 (3).

Te edinstvene lastnosti subkritične vode skupaj z dejstvom, da je voda kot topilo lahko dostopna, poceni, nestrupena, nevljudna in okolju prijazna, vodijo do uveljavljanja številnih načinov uporabe za ekstrakcijo, ločevanje in izolacijo različnih spojin (3). Možnosti uporabe podrobneje opisujemo v podpoglavju 5.

## 3 POSTOPEK EKSTRAKCIJE

### 3.1 PARAMETRI

Glavni parameter ekstrakcije s subkritično vodo je temperatura, saj se z njo spreminjajo glavne kemijsko-fizikalne lastnosti, opisane v podpoglavju 2. Tlak ima omejen vpliv na lastnosti topila, pomembno pa je, da ohranja topilo v tekočem stanju. Ostali pomembni parametri ekstrakcije so razmerje topila in ekstrakcijskega materiala, pretok topila, velikost delcev ekstrakcijskega materiala, čas ekstrakcije, mešanje in uporaba sotopila. Izbira ustreznih delovnih pogojev je lažje določljiva, ko je znana narava spojin, ki jih bomo ekstrahirali (3, 5).

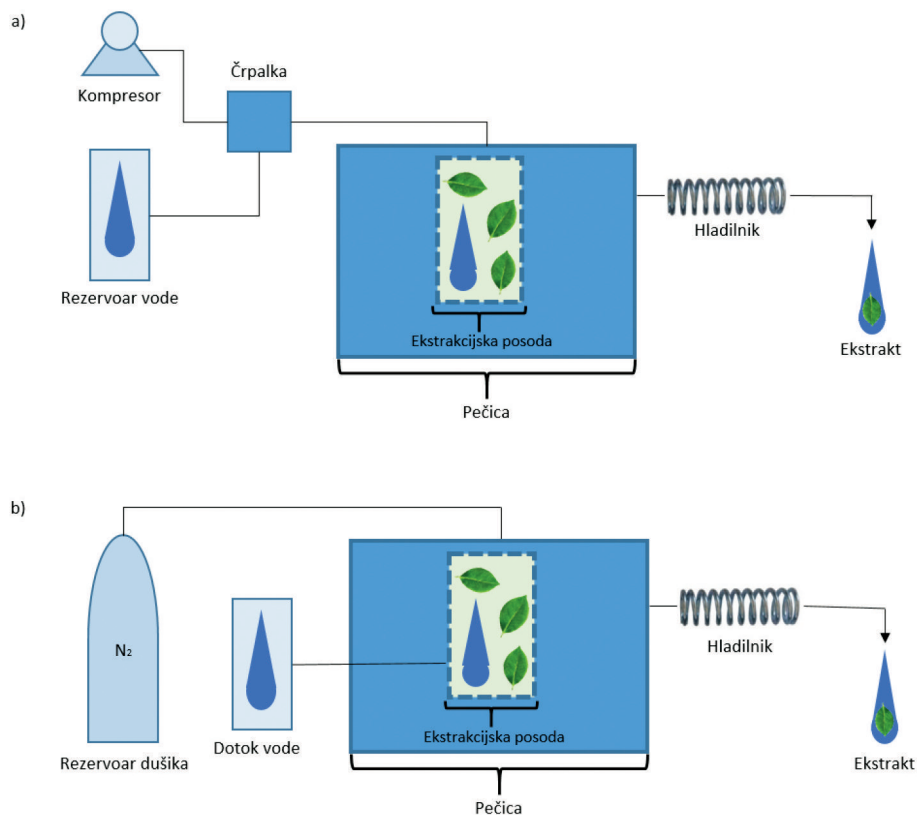
### 3.2 NAPRAVA

Za ekstrakcijo s subkritično vodo obstajata dve vrsti opreme: dinamični (neprekinjeni pretočni) sistem in statični (serijski) sistem (slika 2). Črpalka dinamičnega sistema do-

vaja vodo skozi grelno tuljavo do ekstrakcijske posode. Na ta način se voda predhodno segreje na temperaturo ekstrakcije. Voda nato prehaja skozi ekstraktor do hladilne tuljave, kjer se zbira. Tlak sistema nadzoruje zračna tekočinska črpalka s tlakom od 2 do 200 bar, ogrevanje pa pečica. Da preprečimo odtekanje vzorca oz. njegovo izgubo in morebitno zamašitev cevi, mora imeti posoda za ekstrakcijo sintrane filtre iz nerjavečega jekla vsaj pri izstopu vode iz ekstraktorja. Dinamičen in statičen sistem sta si zelo podobna glede postavitve peči, cevi in ventilov. V nasprotju z dinamičnim sistemom pa statični nima črpalke in je pod podtlakom dušika, da preprečimo oksidacijo vzorca. Čas zadrževanja subkritične vode v dinamični opremi je krajši kot v statični opremi, kar ima za posledico manjšo razgradnjo termolabilnih komponent. Največja pomanjkljivost dinamičnega sistema za ekstrakcijo s subkritično vodo je, da je zaradi večje kompleksnosti naprave dražji od statičnega sistema. Omeniti velja še, da je poraba vode večja pri dinamičnem sistemu. Glavne prednosti dinamičnega sistema pa so krajši čas zadrževanja ekstrakcijskega topila ter posledično manjša razgradnja termolabilnih snovi in večji izplen (5).

## 4 PREDNOSTI IN SLABOSTI EKSTRAKCIJE S SUBKRITIČNO VODO

Pri subkritični ekstrakciji z vodo je čas ekstrakcije navadno krajši in poraba topila je manjša v primerjavi z običajnimi metodami ekstrakcije za pridobivanje sorodnih ekstraktov, kar vodi do manjših obratovalnih stroškov. Poleg tega je subkritična ekstrakcija z uporabo vode namesto organskih topil varen ter okolju prijazen postopek s široko uporabnostjo za pridobivanje funkcionalnih živil ter kozmetičnih in farmacevtskih sestavin. Ekstrakti so v splošnem bolj kompleksni z vidika kemizma, saj ekstrahiramo polarne in tudi manj polarne spojine, subkritična voda pa je v subkritičnih pogojih tudi bolj difuzivna, zato daje večje izplene. Vendar pa je pri uvajanju te metode izredno pomembna optimizacija ekstrakcijskih razmer. Predolg čas segrevanja lahko povzroči termično razgradnjo spojin. Prav tako je večja možnost za potek drugih kemijskih reakcij, kot je Maillardova reakcija. Če želimo končni produkt v suhi obliki, je slabost tudi dodatni korak sušenja oz. koncentriranja, ki ga moramo izvesti po ekstrakciji, saj iz naprave po izvedeni ekstrakciji dobimo vodni ekstrakt. Zato je treba pred uvedbo ekstrakcije s subkritično vodo v industrijskem obsegu sestaviti natančen protokol, da zagotovimo stroško-



Slika 2: Shematski prikaz ekstraktorja s subkritično vodo; a) dinamični ekstraktor, b) statični ekstraktor.

Figure 2: Schematic representation of a subcritical water extractor; a) dynamic extractor, b) static extractor.

vno učinkovitost postopka. Velik strošek pa predstavlja tudi nakup take opreme (4, 6, 7).

## 5 MOŽNOSTI UPORABE

Tehnologija s subkritično vodo je v zadnjih letih zelo raziskovano področje in v prihodnosti pričakujemo več novih možnosti uporabe. Trenutno so najbolj aktualne uporaba produktov v farmaciji, predvsem pri proizvodnji pripravkov rastlinskega izvora, v kozmetični industriji ter v živilstvu.

### 5.1 EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJIN

Večina trenutno objavljenih raziskav o ekstrakciji s subkritično vodo je osredotočena na antioksidante, predvsem fenolne spojine iz različnih virov. Fenoli so razmeroma polarne spojine in spojine z različno termično stabilnostjo, kar je treba upo-

števat pri izbiri ustreznih ekstrakcijskih razmer (3). Antioksidativne fenolne spojine so s subkritično vodo ekstrahirali iz semen granatnega jabolka (*Punica granatum*) (8), grozdnih tropin (*Vitis vinifera*) (9), korenike ingverja (*Zingiber officinale*) (10), olupkov krompirja (*Solanum tuberosum*) (11), cvetov rumene žametnice (*Tagetes erecta*) (12) in plodov vrste papaje (*Vasconcellea pubescens*) (13).

Povečanje izplena ekstrakcije antioksidativnih spojin so v nekaterih primerih dosegli z dodatkom sotopila, kot je etanol, kislina ali baza. Ugotovili so, da sta temperatura nad 175 °C in dolg čas ekstrakcije povezana z večjo antioksidativno aktivnostjo v primeru cvetov rumene žametnice (12).

Glede na kemijsko naravo antioksidativnih spojin, prisotnih v rastlini, lahko razmere ekstrakcije prilagodimo tako, da nekatere spojine selektivno ekstrahiramo. Antocijanidini in fenolne kisline so primeri rastlinskih sekundarnih metabolitov z antioksidativnim delovanjem, ki jih je možno selektivno ekstrahirati (14), saj lahko temperaturo, tlak in čas ekstrakcije optimiziramo glede na število prostih hidroksilnih skupin v molekuli (14, 15). Na ta način so proučevali ekstrakcijo fenolnih spojin iz oplodja manga (*Mangifera indica*)

(3), zeli vednozelenega gornika (*Arctostaphylos uva-ursi*) (3) in lubja cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) (3), ekstrakcijo mircetina, kvercetina in kemferola iz črnega čaja (3), rutina iz ajde (*Fagopyrum esculentum*) (4), izoksantohumola iz hmelja (*Humulus lupulus*) (16) ter hesperidina in narirutina iz lupin citrusov (17), pri čemer so v tej raziskavi štirikrat povečali izplen v primerjavi s klasično ekstrakcijo.

## 5.2 PRIPRAVA DRUGIH OBOGATENIH EKSTRAKTOV

Spreminjanje pogojev ekstrakcije s subkritično vodo v odvisnosti od temperature, tlaka, pretoka in dodanega sotočila so proučevali tudi za pripravo ekstraktov, obogatenih z laktoni iz korenine kave kave (*Piper methysticum*) (18), ter sladilnih spojin steviozidov iz listov stevije (*Stevia rebaudiana*) (19, 20).

## 5.3 EKSTRAKCIJA POLISAHARIDOV

Polisaharidi so velika skupina strukturno raznolikih polimerov, ki vključujejo npr. škrob, celulozo, sluzi in pektine. Zaradi visoke polarnosti so dobri kandidati za ekstrakcijo s subkritično vodo. Tako so s to metodo pridobili pektine iz jabolčnih tropin in lupin citrusov (22), polisaharide iz navadne kustovnice ali goji (*Lycium barbarum*) (6), hemiceluloze iz listov oljne palme (23) ter mono- in oligosaharide iz kokosove moke (24).

## 5.4 PRIDOBIVANJE ALKALOIDOV

Alkaloidi so rastlinski sekundarni metaboliti s širokim spektrom bioloških aktivnosti, ki vsebujejo dušik. Ugotavljanje njihove vsebnosti je pogosto potrebno za vrednotenje in zagotavljanje ustrezne kakovosti rastlinskih drog. Ekstrakcijo s subkritično vodo so uporabili za ekstrakcijo kinolizidinskih alkaloidov citizina, sofokarpina, matrina, soforidina in oksimatrina iz vrste sofore *Sophora flavescens* (25) ter za ekstrakcijo izokinolinskih alkaloidov hidrastina in berberina iz kanadskega hidrasta (*Hydrastis canadensis*) (26).

## 5.5 PRIDOBIVANJE ETERIČNIH OLJ

Ekstrakcijo s subkritično vodo kot metodo pridobivanja eteričnih olj opredelujeta krajši čas ekstrakcije in večji odstotek vsebnosti kisikovih spojin v primerjavi z eteričnimi olji, pridobljenimi s parno destilacijo. Metodo so uporabili za pridobivanje eteričnih olj zeli rožmarina (*Rosmarinus of-*

*ficinalis*) (27), lista origana in bazilike (28), iz listov rastline *Thymbra spicata*, znane tudi pod imenom sredozemski timijan (29), zeli vrtnega šetraja (*Satureja hortensis*) (30), zeli poprove mete (*Mentha × piperita*) (30), listov modrega evkalipta (*Eucalyptus globulus*) (31), zeli navadnega komarčka (*Foeniculum vulgare*) (32), semen koriandra (*Coriandrum sativum*) (33) in korenine ingverja vrste *Zingiber cassumunar* (34). V vseh primerih so sestavo eteričnega olja, ki so ga proizvedli z ekstrakcijo s subkritično vodo pri različnih temperaturah, primerjali s sestavo eteričnega olja, pridobljenega z destilacijo. Na splošno so z ekstrakcijo s subkritično vodo v krajšem času pridobili večji odstotek hlapnih polarnih spojin (21).

# 6 SKLEP

Metoda ekstrakcije s subkritično vodo sodi med uveljavljajoče se zelene, okolju prijazne tehnologije za pridobivanje ekstraktov iz rastlinskega materiala. Ključna ekstrakcijska parametra sta temperatura (>100 °C), saj z višanjem temperature znižujemo dielektrično konstanto vode, in tlak, ki je potreben, da vodo vzdržujemo v tekočem stanju. Bistvenega pomena je tudi čas ekstrakcije, saj ob daljšanju časa pogosto pride do razgradnje zelenih produktov. Glavna razlika v sestavi tako pridobljenih ekstraktov glede na klasične metode je širši nabor ekstrahiranih spojin zaradi posebnih lastnosti vode v subkritičnem stanju. Metodo že uporabljajo za izdelavo izvlečkov v kozmetični industriji, najverjetneje pa ji bosta kmalu sledili tudi farmacevtska in prehrabna industrija. Predvsem v slednji bi lahko ekstrakcija s subkritično vodo v prihodnosti še dodatno pridobila na pomenu zaradi možnosti uporabe v krožnem gospodarstvu.

# 7 LITERATURA

1. Maroun RG, Rajha HN, El Darra N, El Kantar S, Chacar S, Debs E, et al. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. In: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier; 2018. p. 265–93.
2. Chakraborty S, Shaik L, Gokhale JS. Subcritical Water: An Innovative Processing Technology. In: *Innovative Food Processing Technologies*. Elsevier; 2021. p. 552–66.





3. Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. Vol. 109, *Food and Bioprocess Processing*. Institution of Chemical Engineers; 2018. p. 52–73.
4. Essien SO, Young B, Baroutian S. Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. Vol. 97, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 156–69.
5. Jokić S, Aladić K, Šubarić D. Subcritical water extraction laboratory plant design and application. *Environ Sci*. 2018;
6. Chao Z, Ri-Fu Y, Tai-Qiu Q. Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. *Sep Purif Technol*. 2013 Dec 13;120:141–7.
7. Nastić N, Švarc-Gajić J, Delerue-Matos C, Barroso MF, Soares C, Moreira MM, et al. Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. Vol. 111, *Industrial Crops and Products*. 2018. p. 579–89.
8. He L, Zhang X, Xu H, Xu C, Yuan F, Knez Ž, et al. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS + assay. *Food Bioprod Process*. 2012 Apr 1;90(2):215–23.
9. Monrad JK, Suárez M, Motilva MJ, King JW, Srinivas K, Howard LR. Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with a modified expeller. *Food Res Int*. 2014 Dec 1;65(PA):77–87.
10. Anisa NI, Azian N, Sharizan M, Iwai Y. Temperature effects on diffusion coefficient for 6-gingerol and 6-shogaol in subcritical water extraction. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing; 2014. p. 012009.
11. Singh PP, Saldaña MDA. Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Res Int*. 2011 Oct 1;44(8):2452–8.
12. Xu H, Wang W, Jiang J, Yuan F, Gao Y. Subcritical water extraction and antioxidant activity evaluation with on-line HPLC-ABTS+ assay of phenolic compounds from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower residues. *J Food Sci Technol [Internet]*. 2015 Jun 29 [cited 2020 Oct 23];52(6):3803–11.
13. Uribe E, Delgadillo A, Giovagnoli-Vicunã C, Quispe-Fuentes I, Zura-Bravo L. Extraction techniques for bioactive compounds and antioxidant capacity determination of chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) fruit. *J Chem*. 2015;2015.
14. Ko MJ, Cheigh CI, Chung MS. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chem*. 2014 Jan 15;143:147–55.
15. Lekar A V, Borisenko SN, Vetrova E V, Sushkova SN, Borisenko NI. Extraction of quercetin from *Polygonum hydropiper* L. by subcritical water. *Am J Agric Biol Sci*. 2013 Nov 23;9(1):1–5.
16. Gil-Ramírez A, Mendiola JA, Arranz E, Ruíz-Rodríguez A, Reglero G, Ibáñez E, et al. Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2012 Oct;16:54–60.
17. Cheigh CI, Chung EY, Chung MS. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water. *J Food Eng*. 2012 Jun 1;110(3):472–7.
18. Kubátová A, Miller DJ, Hawthorne SB. Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root. *J Chromatogr A*. 2001 Jul 20;923(1–2):187–94.
19. Teo CC, Tan SN, Yong JWH, Hew CS, Ong ES. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J Sep Sci*. 2009;32(4):613–22.
20. Yildiz-Ozturk E, Tag O, Yesil-Celiktas O. Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *J Supercrit Fluids*. 2014 Nov 1;95:422–30.
21. Abdelmoez W, Abdelfatah R. Therapeutic Compounds From Plants Using Subcritical Water Technology. In: *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development*. Elsevier; 2017. p. 51–68.
22. Wang X, Chen Q, Lü X. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocoll*. 2014 Jul 1;38:129–37.
23. Norsyabilah R, Hanim SS, Suhaila N, Noraishah A, Kartina S. Subcritical water extraction of monosaccharides from oil palm fronds hemicelluloses (Pengekstrakan Air Subgenting Daripada Monosakarida Dari Hemiselulosa Pelepah Kelapa Sawit). Vol. 17, *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 2013.
24. Khuwijiitjaru P, Pokpong A, Klinchongkon K, Adachi S. Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. *Int J Food Sci Technol*. 2014 Aug 1;49(8):1946–52.
25. Wang H, Lu Y, Chen J, Li J, Liu S. Subcritical water extraction of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. and determination by capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Jan 25;58(1):146–51.
26. Mokgadi J, Turner C, Torto N. Pressurized Hot Water Extraction of Alkaloids in Goldenseal. *Am J Anal Chem*. 2013;04(08):398–403.
27. Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, Ibáñez E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J Chromatogr A*. 2010 Apr;1217(16):2512–20.
28. Yang Y, Kayan B, Bozer N, Pate B, Baker C, Gizir AM. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *J Chromatogr A*. 2007 Jun 8;1152(1–2):262–7.
29. Ozel MZ, Gogus F, Lewis AC. Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chem*. 2003 Aug 1;82(3):381–6.
30. Kubatova A, Lagadec AJM, Miller DJ, Hawthorne SB. Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavour Fragr J*. 2001 Jan 1;16(1):64–73.
31. Jiménez-Carmona MM, Luque de Castro MD. Isolation of eucalyptus essential oil for GC-MS analysis by extraction with subcritical water. *Chromatographia*. 1999;50(9–10):578–82.
32. Gámiz-Gracia L, Luque de Castro MD. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: Comparison with conventional techniques. *Talanta*. 2000 May 5;51(6):1179–85.
33. Eikani MH, Golmohammad F, Rowshanzamir S. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *J Food Eng*. 2007 May 1;80(2):735–40.
34. Chienthavorn O, Poonsukcharoen T, Pathrakorn T. Pressurized Liquid and Superheated Water Extraction of Active Constituents from *Zingiber cassumunar* Roxb. Rhizome. *Sep Sci Technol*. 2011 Feb 25;46(4):616–24.