

ISSN 1010-8313

PROCEEDING

**THE
2006
SEMINAR**
ON ANALYTICAL CHEMISTRY

*Revitalization of Analytical Chemistry
Development of Smart Material, Biotechnology
and Environmental Science*



March 9th, 2006
Yogyakarta, Indonesia

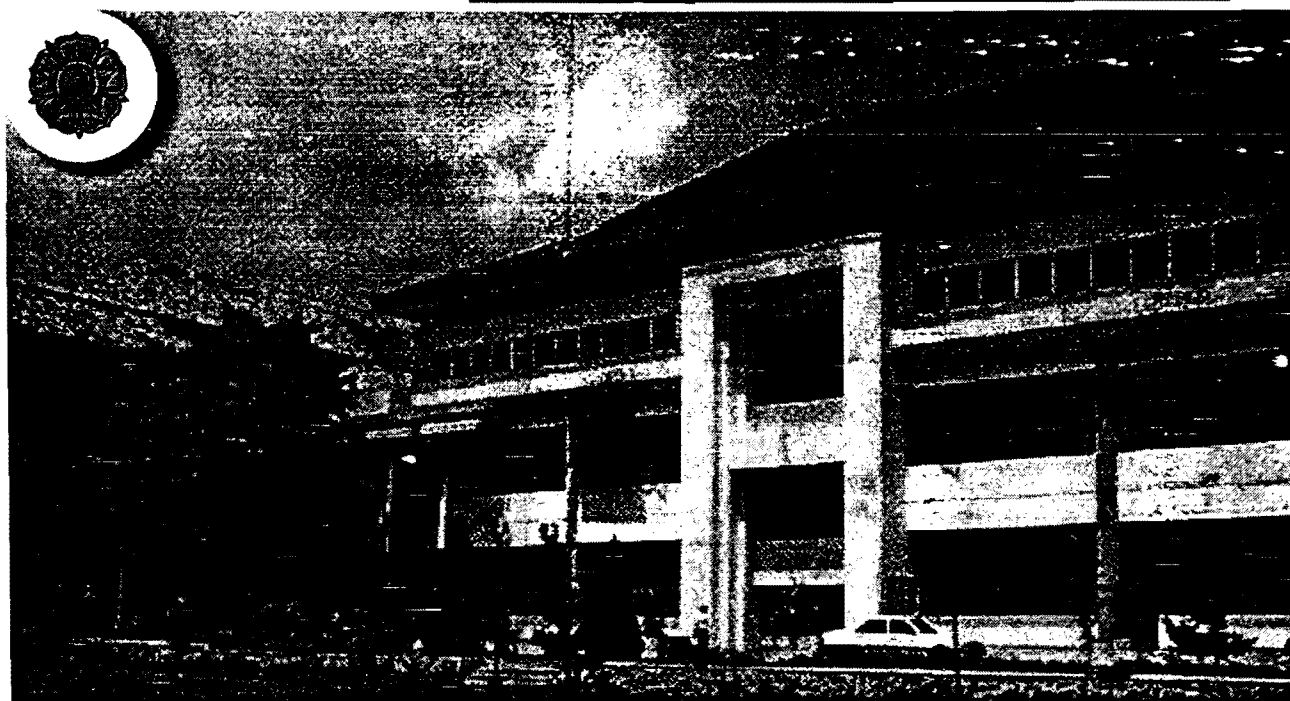
Chemistry Department
Faculty of Mathematics and
Natural Sciences
Gadjah Mada University Yogyakarta

ISSN: 1410-8313

PROCEEDING

THE
2006
SEMINAR
ON ANALYTICAL CHEMISTRY

*Revitalization of Analytical Chemistry in the
Development of Smart Material, Biomaterial
and Environmental Sciences*



March 9th 2006
Yogyakarta, Indonesia

Chemistry Department
Faculty of Mathematics and
Natural Sciences
Gadjah Mada University Yogyakarta

RAPID ANALYSIS OF TOTAL FLAVONOIDS FROM MEDICINAL HERB: INTERPRETATION OF CHEMOMETRICS ON INFRARED SPECTRA OF *PHYLLANTUS NIRURI*

Eti Rohaeti ^{a,*}, Rudi Heryanto ^{a,b}, Mohamad Rafi ^a, Latifah K. Darusman ^{a,b},
Indah Kurniasari^a

^{a)} Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences Bogor Agricultural University
Kampus IPB Baranangsiang, Jl. Pajajaran Bogor 16151 Phone: +62-251-381949 Fax: +62-251-312642
E-mail: lkm@chem.fmipa.ipb.ac.id

^{b)} Biopharmaca Research Center, Bogor Agricultural University
Kampus IPB Taman Kencana, Jl. Taman Kencana No. 3 Bogor 16151

ABSTRACT

The potential of mid-infrared (FTIR) spectroscopy for the determination of secondary metabolites (total flavonoids) in *Phyllanthus niruri* herb was investigated. The study are applying chemometrics technique (i.e. partial least squares, PLS) to modeling relation between reference value of total flavonoids and original or preprocessing FTIR spectra of herb. Based on the reference values, received by reference method from Department of Health, the correlation strength between these data and the FTIR prediction is shown by the R^2 statistics. Furthermore, the standard error of cross validation (SEP) was found to be the best additional estimate of prediction accuracy. Applying partial least square algorithm result satisfactory calibration statistics (SEP, R^2) for the FTIR determination of total flavonoids (0,12, 0.80). The performed study demonstrates that FTIR can be used to rapidly and accurately predict total flavonoids from *Phyllanthus niruri*.

Keyword: Rapid Analysis, FTIR, Chemometrics, Total Flavonoid, PLS

PENDAHULUAN

Kandungan kimia dalam simplisia tumbuhan obat akan bervariasi tergantung pada kondisi tumbuh/ lingkungan, keadaan geografis dan faktor genetiknya. Oleh karena itu, ketika simplisia tersebut akan digunakan sebagai bahan baku obat, kadar komponen kimia bioaktifnya perlu diketahui sehingga kualitas, keamanan dan khasiat produk turunannya dapat dipertanggungjawabkan. Salah satu tumbuhan yang banyak digunakan sebagai bahan baku obat bahan alam adalah meniran (*Phyllanthus niruri*). Tumbuhan obat ini kaya akan senyawa flavonoid terutama flavonoid jenis kuersetin. Untuk melakukan analisis kadar flavonoidnya dapat digunakan beberapa metode seperti metode kolorimetrik

(Chang *et al.* 2002), kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), dan elektroforesis kapiler (Marchart *et al.* 2003). Namun, dalam pelaksanaannya, penentuan flavonoid menggunakan metode-metode di atas harus melalui serangkaian tahapan preparasi sampel yang membutuhkan waktu lama (*laborious*). Oleh karena itu, dari sisi praktis, diperlukan metode alternatif yang relatif lebih sederhana, cepat dan mudah. Salah satu metode yang berpotensi memenuhi kriteria tersebut adalah metode yang dikembangkan dari interpretasi teknik kemometrik terhadap spektra inframerah. Untuk itu, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode cepat kuantifikasi kadar total flavonoid dari simplisia bahan baku obat (meniran) yang didasarkan pada penggunaan teknik

spektroskopi inframerah (FTIR) dan metode kemometrik.

Teknik spektroskopi inframerah dapat digunakan untuk melakukan pengukuran komponen kimia sampel secara cepat tanpa merusak sampel dan mampu menganalisis beberapa komponen secara serentak. Untuk suatu sampel yang kompleks, spektra FTIR yang dihasilkan melalui interaksi antara energi sinar inframerah dan komponen kimia penyusun sampel dapat menjadi representasi kualitatif dan kuantitatif komponen kimia dalam sampel tersebut. Diperlukan metode kemometrik untuk dapat mengekstrak informasi kualitatif dan kuantitatif dari suatu spektra FTIR sampel yang kompleks.

Metode kemometrik mengintegrasikan model statistik dan matematika untuk mengekstrak informasi yang relevan dari data spektra inframerah. Aplikasi kemometrik dalam interpretasi spektra FTIR diantaranya telah dilakukan oleh Chew *et al.* (2004) untuk mengklasifikasi teh jawa (*Orthosiphon stamineus* Benth), tumbuhan obat yang berkhasiat untuk mengatasi infeksi kantung kemih, infeksi ginjal, dan batu ginjal, dari beberapa tempat dan varietas yang berbeda; Jajang (2004) dalam pengelompokan ekstrak daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.); Baranska *et al.* (2005) pada kontrol kualitas ekstrak dan produk farmasi *Harpagophytum procumbens*, tumbuhan pereda nyeri; dan Zou *et al.* (2005) pada proses kontrol kualitas beberapa tumbuhan obat yang digunakan dalam pengobatan tradisional Cina.

Dalam penelitian ini, metode kemometrik digunakan untuk menemukan korelasi statistik antara data spektrum dan informasi yang telah diketahui dari sampel, yang dalam hal ini berupa konsentrasi flavonoid. Konsentrasi flavonoid dari setiap sampel diukur dengan menggunakan metode rujukan yang diakui. Spektrum FTIR dari sampel yang telah diketahui konsentrasi flavonoidnya tersebut lalu digunakan untuk membentuk suatu model kalibrasi multivariat dengan metode statistika berupa *Partial Least Square* (PLS). Keabakan metode kalibrasi yang terbentuk ditinjau dari nilai R-square, SEC (*Standar Error of Calibration*), dan sebagai tambahan dilakukan pula analisis komponen utama (PCA, *Principal Component Analysis*) untuk melihat pengelompokan sampel

meniran berdasarkan kandungan flavonoid totalnya.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel daun meniran yang diperoleh dari tiga daerah (Bantar Kambing, Darmaga, dan Cisarua), standar kuersetin, etanol, larutan 0,5% heksametilentetramina, aseton, larutan 25% HCl dalam air, etil asetat, larutan asam asetat glasial 5% dalam metanol, AlCl₃ 2% dalam asam asetat 5%, akuades, dan kapas.

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini yaitu spektrometer FTIR Tensor 37 (Bruker Spectrospin) yang dilengkapi dengan perangkat lunak OPUS, komputer pengolah data (Processor Intel Pentium IV, 2,6 GHz, RAM 256 MB), software kemometrik (Unscrambler Ver. 9.5, Camo Inc.) spektrometer UV Genesys 10, perangkat maserasi dan refluks, penguap putar, penangas air, neraca analitik, labu takar, pipet Mohr dan volumetrik berbagai ukuran, corong pisah, gelas ukur, gelas arloji, dan gelas piala.

Penentuan Konsentrasi Flavonoid dengan Metode Rujukan (Depkes RI, 2000)

Sebanyak 10 gram serbuk daun meniran kering, dimaserasi menggunakan 60 ml etanol selama 6 jam di atas *shaker* kemudian disaring. Filtrat disimpan, sedangkan residu direfluks dalam 40 ml etanol selama 3 jam. Hasil refluks disaring dan filtratnya dipindahkan ke labu lain. Residu direfluks kembali dengan etanol. Filtrat hasil maserasi dan refluks digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan evaporator putar sampai terbentuk ekstrak kental. Ekstrak kental dimasukkan ke dalam oven untuk menghilangkan sisa etanol.

Ekstrak kering lalu ditimbang setara dengan 200 mg simplisia lalu dihidrolisis dengan menggunakan 1,0 ml larutan 0,5% b/v heksametilentetramina, 20,0 ml aseton, dan 2,0 ml larutan 25% HCl dalam air. Hidrolisis dilakukan dengan pemanasan sampai mendidih selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring menggunakan kapas ke dalam labu takar 100 ml. Residu hidrolisis ditambah 20 ml aseton untuk dididihkan kembali sebentar,

penambahan aseton dan pendidihan ini dilakukan sebanyak 2 kali. Filtrat dikumpulkan ke dalam labu takar. Setelah labu ukur dingin, maka volume ditepatkan hingga tera dan dikocok hingga tercampur sempurna. Sebanyak 20 ml filtrat hasil hidrolisis dipindahkan dalam corong pisah, lalu ditambahkan 20 ml akuades. Ekstraksi kocok dilakukan dengan 15 ml etil asetat (satu kali) dan 10 ml etil asetat (dua kali). Fraksi etilasetat dikumpulkan ke dalam labu ukur 50,00 ml dan ditambahkan etilasetat sampai tepat 50,00 ml. Untuk replikasi spektrofotometri prosedur dilakukan 3 kali.

Analisis spektrofotometri diawali dengan memindahkan 10 ml larutan fraksi etilasetat ke dalam labu ukur 25 ml, kemudian ditambahkan 2 ml larutan 2g AlCl₃ 2% dan diencerkan menggunakan larutan asam asetat 5% hingga tera. Sebagai standar digunakan larutan kuersetin murni dalam etilasetat dengan konsentrasi 3, 6, 12, 15, dan 24 ppm, lalu diukur pada λ_{max} 370,8 nm.

Analisis Spektroskopi FTIR Sampel Meniran

Sebanyak 0,5 mg sampel daun meniran yang telah dikeringkan dan dihaluskan dicampur dengan 180 mg KBr untuk dijadikan pelet. Pelet dibuat menggunakan *hand press* Shimadzu dengan tekanan sebesar 8 ton selama 10 menit. Pengukuran spektrum dilakukan dengan menggunakan spektrometer FTIR. Sebuah komputer personal yang dilengkapi dengan Software OPUS digunakan untuk mengontrol kerja spektrometer pada kisaran daerah 4000-400 cm⁻¹. Spektrum yang dihasilkan lalu disimpan dalam OPUS format.

Spektrum asli juga diberikan perlakuan pendahuluan. Data spektrum dinormalisasi sehingga absorbansi terkecil diset menjadi 0 sedangkan absorbansi tertinggi diset menjadi 1. Hasil normalisasi kemudian diberikan koreksi *baseline* dan dilanjutkan dengan derivatisasi dan *smoothing* dengan menggunakan metode Savitzky-Golay.

Analisis Data Secara Kemometrik

Spektrum FTIR dalam format OPUS disimpan dalam format Data Point Table (DPT) yang dapat dibuka dengan menggunakan program Excel. Data absorbansi lalu dipotong pada bilangan gelombang 2499-2250 cm⁻¹ untuk menghilangkan serapan CO₂

yang dapat mengganggu analisis selanjutnya. Data kemudian dibagi menjadi empat jenis, data absorbansi utuh dengan 1762 titik (bilangan gelombang 3996-399 cm⁻¹, model 1 tanpa perlakuan pendahuluan, dan model 5 dengan perlakuan pendahuluan), segmentasi pertama dengan 1251 titik (bilangan gelombang 3730-2812 dan 1890-399 cm⁻¹, model 2 tanpa perlakuan pendahuluan, dan model 6 dengan perlakuan pendahuluan), segmentasi kedua dengan 477 titik (bilangan gelombang 3730-2812 cm⁻¹, model 3 tanpa perlakuan pendahuluan, dan model 7 dengan perlakuan pendahuluan), dan segmentasi ketiga dengan 774 titik (bilangan gelombang 1890-399 cm⁻¹, model 4 tanpa perlakuan pendahuluan, dan model 8 dengan perlakuan pendahuluan).

Analisis PCA dan PLS dilakukan dengan menggunakan software The Unscrambler Versi 9.5.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Flavonoid Meniran

Kadar flavonoid meniran yang terukur dengan menggunakan metode Depkes ditunjukkan pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Kadar flavonoid total meniran.

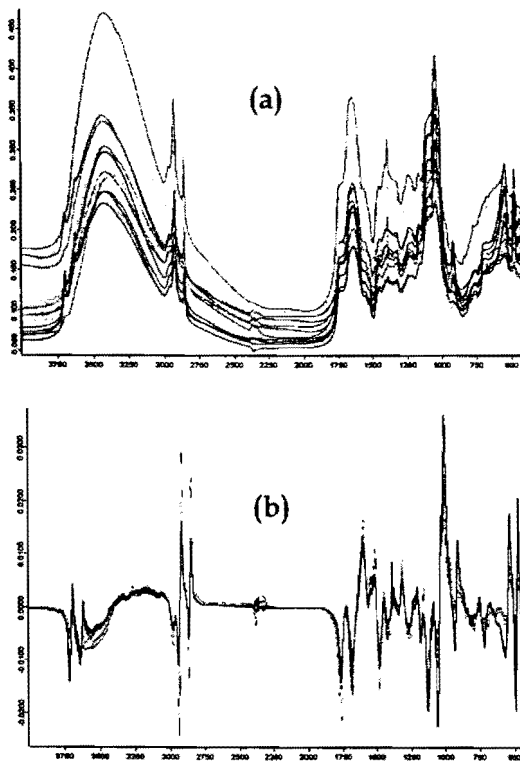
Sampel	Kadar flavonoid (% b/b)	Asal Sampel
1	1,54	Bantarkambang
2	1,42	(Kelompok A)
3	1,56	
4	1,62	
5	1,64	
6	1,46	Darmaga
7	1,36	(Kelompok B)
8	1,39	
9	1,34	
10	1,46	
11	1,16	Cisarua
12	1,08	(Kelompok C)
13	1,34	
14	1,16	
15	0,98	

Terlihat perbedaan nilai kadar flavonoid sampel yang berasal dari tiga tempat berbeda. Meniran dari daerah Bantar Kambang memiliki kandungan flavonoid terbesar dibandingkan meniran dari daerah Darmaga

dan Cisarua. Hal ini disebabkan oleh perbedaan lingkungan tempat tumbuhnya tanaman tersebut. Perbedaan kondisi lingkungan dapat mempengaruhi konstituen kimia tanaman (Sumannen 1999). Konsentrasi flavonoid dan senyawa fenolik lain di dalam tanaman berbeda-beda di antara setiap bagian tanaman, jaringan, dan umur tanaman, dan dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan. Faktor-faktor ini adalah temperatur, sinar ultraviolet dan tampak, nutrisi, ketersediaan air, dan konsentrasi CO₂ pada atmosfer.

Spektrum Inframerah Meniran

Spektrum inframerah dari 15 sampel meniran ditunjukkan pada Gambar 1. Pola spektrum ini disusun oleh serapan vibrasi dari seluruh konstituen yang ada di dalam sel utuh meniran. Kelimabelas spektrum inframerah meniran memberikan pola absorbansi yang mirip, hanya berbeda pada nilai kuantitatif absorbansi dari masing-masing spektrum.



Gambar 1. Spektrum inframerah 15 sampel meniran: (a) tanpa diberikan perlakuan pendahuluan, (b). Setelah diberikan perlakuan pendahuluan.

Gambar 1a menunjukkan spektrum absorbansi sel utuh meniran tanpa perlakuan awal. Puncak serapan tajam pada daerah 1600-1760 cm⁻¹ disebabkan oleh vibrasi C=O pada senyawa karbonil yang dapat memperlihatkan kandungan flavonoid (flavonol) pada sampel. Puncak yang tajam dan sempit pada 2925 cm⁻¹ dan 2848 cm⁻¹ berturut-turut merupakan serapan gugus C-H dan C-H metoksi. Gugus hidroksil memberikan serapan pada daerah 3000-3700 cm⁻¹.

Selain spektrum absorbansi asli, analisis kemometrik juga dilakukan pada spektrum yang telah diberikan perlakuan pendahuluan. Gambar 1b menunjukkan spektrum hasil perlakuan pendahuluan. Terlihat bahwa setelah diberikan perlakuan pendahuluan, kelimabelas spektrum menjadi lebih seragam. Perlakuan pendahuluan ini dapat menghilangkan gangguan *baseline* spektrum dan mengurangi noise acak pada spektrum awal sehingga akan meningkatkan hasil analisis kemometrik (Naes *et al.* 2002). Derivatisasi akan menghilangkan pergeseran *baseline* dan tumpang tindih puncak, sehingga informasi spektrum yang berguna untuk analisis selanjutnya akan meningkat (Stchur *et al.* 2002).

Segmentasi data dilakukan pada daerah-daerah yang memberikan serapan berarti dalam spektrum inframerah keseluruhan. Penggunaan data spektrum pada kisaran tertentu dapat meningkatkan hasil analisis kemometrik. Segmentasi data dapat mengurangi wilayah spektrum yang mengandung banyak *noise*. Namun karena sebagian informasi juga akan turut terbuang, hasil analisis dapat menjadi tidak memuaskan (Zou *et al.* 2005). Pengaruh variabel pada masing-masing kisaran segmentasi ini akan dilihat dalam analisis kemometrik selanjutnya.

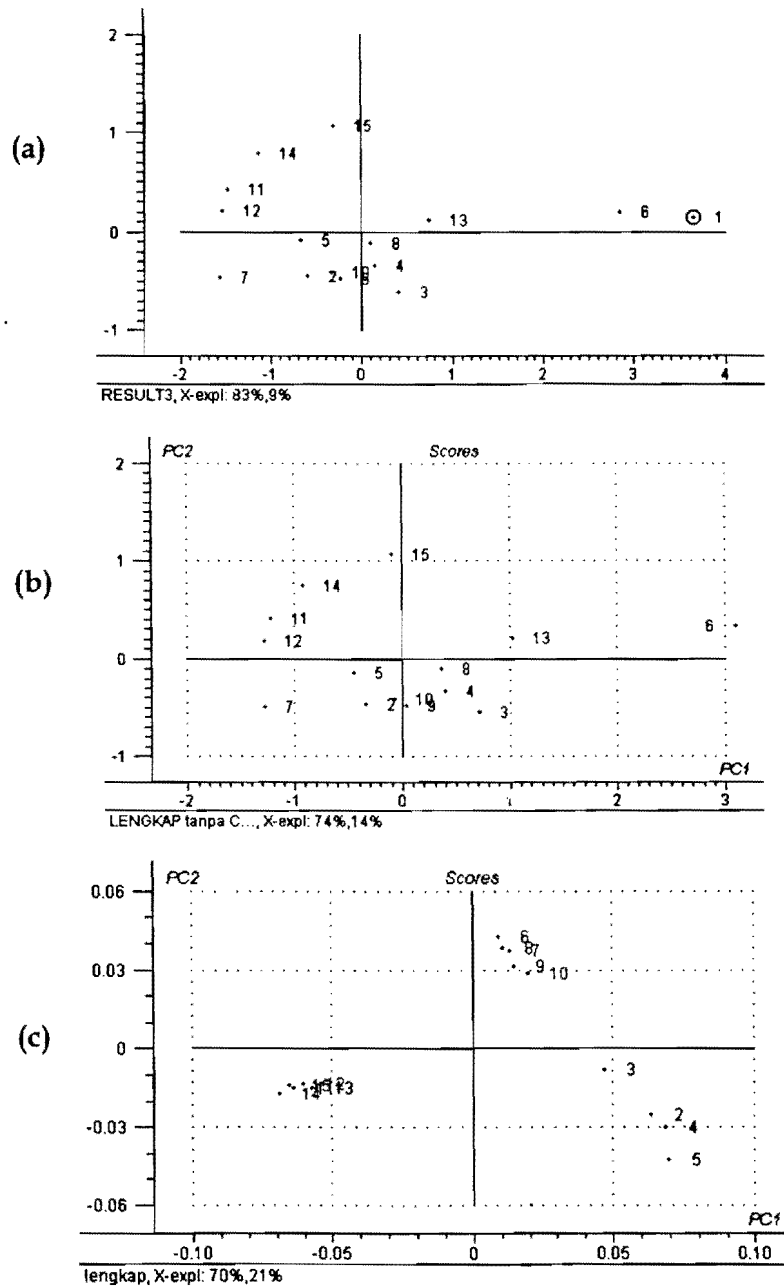
Klasifikasi Sampel Meniran dengan PCA

Pengelompokan meniran dari tiga daerah diperlihatkan pada *score plot* dua dimensi dengan menggunakan analisis komponen utama. Plot ini memberikan informasi mengenai pola yang terdapat pada sampel. *Score plot* untuk dua PC pertama biasanya paling berguna dalam analisis karena kedua PC ini mengandung paling banyak variasi dalam data. Semakin dekat

sampel dengan sampel lain maka akan semakin besar kemiripan di antara sampel-sampel tersebut.

Analisis komponen utama terlebih dahulu dilakukan pada data yang berasal dari spektrum absorbsi utuh tanpa perlakuan pendahuluan dengan melibatkan 1762 titik.

Gambar 2a menunjukkan bahwa *score plot* dua PC pertama mampu menjelaskan 92% dari variansi total (PC1= 83%, PC2= 9%). Namun, pola pengelompokan sampel masih tidak terlihat jelas. Plot sampel kelompok C (sampel nomor 11-15) telah terlihat berdekatan, sampel-sampel kelompok A dan B masih saling bergabung dan belum dapat



Gambar 2. *Score plot* dua PC pertama spektrum tanpa perlakuan pendahuluan: (a). spektrum utuh dengan outlier, (b). spektrum utuh tanpa outlier, (c). spektrum utuh yang diberi perlakuan pendahuluan.

terlihat pengelompokannya. Sampel nomor 1 terlihat sangat terpisah dari kelompoknya, dan program Unscrambler mengidentifikasinya sebagai *outlier*. *Outlier* dapat disebabkan oleh adanya galat pengukuran, sampel dari kategori lain, atau kesalahan instrumental (Stchur *et al.* 2002). Sampel ini kemudian dihilangkan dan tidak disertakan lagi dalam proses analisis selanjutnya. Pola pemisahan sampel lebih terlihat dengan jelas (Gambar 2c) dari hasil analisis komponen utama terhadap spektra FTIR sampel yang diberi perlakuan pendahuluan. Dua PC pertama pada score plot dari data spektrum utuh mampu menjelaskan 91% dari variansi total (PC1=70%, PC2=21%).

Prediksi Kadar Flavonoid dengan PLS

Metode PLS dilakukan untuk membentuk persamaan kalibrasi yang akan menghubungkan spektrum inframerah meniran terhadap konsentrasi flavonoid yang telah diketahui. Metode ini akan menghubungkan nilai absorbansi sebagai prediktor (X) dengan nilai konsentrasi sebagai respon (Y).

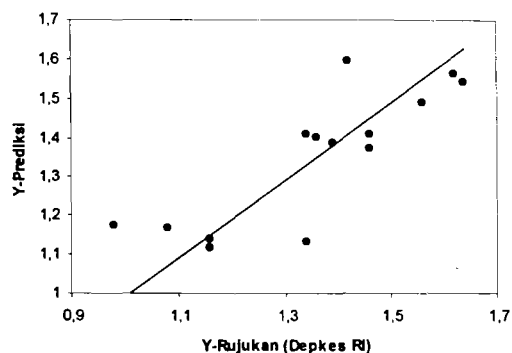
Idealnya data dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama digunakan untuk pembentukan model atau dikenal sebagai *training set*, dan bagian kedua dikenal sebagai *test set* yang digunakan untuk menguji model

yang telah dibentuk. Karena keterbatasan jumlah sampel yang dianalisis menyebabkan semua data yang ada hanya dijadikan data latihan untuk membangun model kalibrasi. Mekanisme pengujian model dilakukan melalui sistem validasi silang. Kemampuan prediksi model dapat dilihat dari nilai korelasi dan RMSEP dari model tersebut. Model prediksi yang baik memiliki nilai korelasi antara nilai *y* prediksi dengan nilai *y* sebenarnya yang tinggi dan RMSEP yang rendah (Naes *et al.* 2002).

Tabel 2 memperlihatkan hasil statistik dari metode PLS yang telah dilakukan. Pemilihan model yang terbaik dilakukan berdasarkan pada beberapa parameter, yang paling penting adalah nilai *r*-square dan galatnya. Agar model yang terbentuk tidak *overfitted*, nilai *r*-square dan galat pada saat kalibrasi dan validasi harus berdekatan. Perbedaan galat kalibrasi dan validasi yang masih dapat diterima untuk suatu model maksimal berbeda dua kali lipatnya (Baranska *et al.* 2005). Berdasarkan kriteria ini, model kalibrasi yang terbaik adalah model 6 yang memiliki galat dan *r*-square (*SEP*, *R*²) sebesar 0,11 dan 0,83. Model 6 memprediksi kandungan flavonoid total meniran dapat dilihat pada Gambar 3.

Tabel 2. Parameter Kinerja dari berbagai model PLS yang dihasilkan dari segmentasi Spektra FTIR.

Model	Parameter Kinerja Model					
	R ²			Galat		
	Kalibrasi	Validasi	RMSEC	RMSEP	SEC	SEP
Model 1	0,944982	0,812025	0,062665	0,115934	0,065030	0,120091
Model 2	0,943271	0,801752	0,063604	0,118613	0,066005	0,122334
Model 3	0,963600	0,882018	0,051214	0,091137	0,053148	0,093832
Model 4	0,876252	0,787920	0,092305	0,120084	0,095790	0,124316
Model 5	0,894222	0,833434	0,085748	0,106108	0,088985	0,110042
Model 6	0,894449	0,833810	0,085661	0,105997	0,088895	0,109928
Model 7	0,890030	0,813360	0,087334	0,112279	0,090631	0,116493
Model 8	0,867390	0,795477	0,095327	0,116729	0,098928	0,121020



Gambar 3. Plot nilai prediksi dan rujukan dari kandungan flavonoid total yang didapatkan dari model 6 (lihat Tabel 2, parameter model). Nilai dalam % (b/b).

KESIMPULAN

Kadar flavonoid total dari masing-masing simplisia berbeda berdasarkan asal daerahnya. Kandungan flavonoid simplisia meniran tertinggi berasal dari daerah Bantar kambing (1,64%). Pengelompokan meniran berdasarkan asal daerah dapat terlihat dari analisis PCA spektra FTIR meniran yang diberikan perlakuan pendahuluan. Model kalibrasi yang dibangun menggunakan metode PLS cukup baik untuk memprediksi kandungan flavonoid meniran berdasarkan spektra FTIRnya. Model yang terbaik adalah model 6 yang memiliki parameter kinerja model R^2 dan galat (R^2 Cal = 0,89, R^2 val = 0,83, SEC = 0,088, dan SEP = 0,11).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Program Penelitian Dasar, DIKTI Depdiknas dengan Nomor Perjanjian 026/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baranska M *et al.* 2005. Quality Control of *Harpagophytum procumbens* and Its Related Phytopharmaceutical Products by Means of NIR-FT-Raman Spectroscopy. *Biopolymers* 77:1-8.
2. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J Food Drug Anal* 10: 178-182.
3. Chew OS, Hamdan MZ, Ismail Z, Ahmad MN. 2004. Assessment of Herbal Medicines by Chemometrics - Assisted Interpretation of FTIR Spectra. *J Anal Chim Acta*.
4. [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI.
5. Jajang 2004. Penerapan Analisis *Artificial Neural Networks* (ANN) Dalam Pengelompokan Ekstrak Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk). Tesis Sekolah Pasca Sarjana IPB, Bogor
6. Marchart E, Krenn L, Kopp B. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. *Planta Med* 69(5):452-6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12802728&dopt=Abstract [15 Mei 2005].
7. Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies T. 2002. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. Chichester, UK: NIR Publications.
8. Schulz H, Drews HH, Quilitszh R, Kruger H. 1998. Application of Near Infrared Spectroscopy for The Quantification of Quality Parameters in Selected Vegetables and Essential Oil Plants. *J Near Infrared Spectrosc* 6:A125-A130.
9. Schulz H, Drews HH, Kruger H. 1999. Rapid NIRS Determination of Quality Parameters in Leaves and Isolated Essential Oils of *Mentha* Species. *J Essent Oil Res* 11:185-190.
10. Shao X, Zhuang Y. 2004. Determination of Chlorogenic Acid in Plant Samples by Using Near-Infrared Spectrum with Wavelet Transform Preprocessing. *Anal Sci* 20.
11. Stchur P, Cleveland D, Zhou J, Michel RG. 2002. A Review of Recent Applications of Near Infrared Spectroscopy, and the Characteristics of A Novel PbS CCD Array-Based Near Infrared Spectrometer. *Appl Spect Rev* 37:383-428.

12. Summanen JA. 1999. A Chemical and Ethnopharmacological Study on *Phyllanthus emblica* (Euphorbiaceae) [disertation]. Helsinki: Faculty of Science, University of Helsinki.
13. Zou HB *et al.* 2005. Progress in Quality Control of Herbal Medicine with IR Fingerprint Spectra. *Anal Lett* 38:1457-1475.