

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ QUERCETIN DƯỢC DỤNG

**Phạm Thị Hiền¹, Phạm Thị Hồng Thêu¹, Đào Nguyệt Sương Huyền¹,
Nguyễn Thị Ngọc², Nguyễn Hòa Bình¹, Phạm Thái Hà Văn¹, Nguyễn Văn Giang¹,
Bùi Thị Thúy Luyện¹, Nguyễn Văn Hải^{1*}**

1. Trường Đại học Dược Hà Nội,

2. Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên

*Email: hainv@hup.edu.vn

Ngày nhận bài: 20/11/2024

Ngày phản biện: 09/01/2025

Ngày duyệt đăng: 25/01/2025

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Ở Việt Nam, cũng đã có các nghiên cứu điều chế quercetin từ rutin, tuy nhiên các phương pháp này đều chưa có đánh giá đầy đủ về chất lượng sản phẩm. Chính vì vậy đề tài được thực hiện. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng được quy trình điều chế quercetin từ rutin đạt tiêu chuẩn USP44. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đối tượng: Rutin (95%), các hóa chất đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích. Phương pháp: Điều chế quercetin từ rutin bằng phản ứng thủy phân; theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM); tinh chế bằng phương pháp kết tinh, hấp phụ và kết tủa phân đoạn theo pH; kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM và đo nhiệt độ nóng chảy. Đánh giá chất lượng quercetin theo các phương pháp trong chuyên luận của USP44, trong đó định lượng bằng HPLC được thẩm định theo hướng dẫn của ICH. Cấu trúc quercetin được xác định thông qua các phương pháp phân tích phổ (phổ khối lượng MS; phổ hồng ngoại IR và phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR; ¹³C-NMR). **Kết quả:** Các thông số quy trình thủy phân quercetin thô từ rutin với quy mô 10,0 g/mẻ: tác nhân là hỗn hợp ethanol 96%/HCl 20% (tỷ lệ 3:1), nhiệt độ 80-90°C, thời gian 2 giờ. Tinh chế quercetin thô: đánh giá được các dung môi: isopropanol, ethanol, dicloromethan, nước (thay đổi pH); thực hiện qua hai giai đoạn (i) Thay đổi pH cho kết quả phân đoạn pH 4 cho sản phẩm hàm lượng 99,8%, tổng tạp chất 0,3% đạt yêu cầu được đề cập trong chuyên luận dược điển. (ii) Kết tinh lại trong ethanol 96% nóng tỷ lệ 1:30. Hiệu suất toàn quy trình khoảng 47%. Sản phẩm quercetin đạt các chỉ tiêu chất lượng được yêu cầu trong chuyên luận USP44. **Kết luận:** Đã xây dựng được quy trình điều chế quercetin đạt các chỉ tiêu chất lượng theo chuyên luận của USP44.

Từ khóa: quercetin, rutin, tinh chế, pH, thủy phân, HPLC.

ABSTRACT

RESEARCH ON THE PREPARATION OF QUERCETIN TO ACHIEVE PHARMACEUTICAL STANDARDS

**Pham Thi Hien¹, Pham Thi Hong Theu¹, Dao Nguyet Suong Huyen¹,
Nguyen Thi Ngọc², Nguyen Hoa Binh¹, Pham Thai Ha Van¹, Nguyen Van Giang¹,
Bui Thi Thuy Luyện¹, Nguyen Van Hai^{1*}**

1. Hanoi University of Pharmacy

2. Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy

Background: Studies on the synthesis of quercetin from rutin have also been conducted in Vietnam; however, there are numerous obstacles in the way of preparing pure quercetin, and the quality of the hydrolyzed products has not been fully evaluated in accordance with pharmaceutical standards. The "Research on the preparation of quercetin for pharmaceutical grade" was undertaken for this reason. **Objectives:** To develop a process for preparing quercetin from rutin that meets USP44 pharmacopoeia standards and evaluated the quality indicators of quercetin

according to the requirements of the pharmacopoeia treatise. **Materials and methods:** Research subjects: Rutin (extracted from *Flos Sophorae*, 95%) - Vietnam, chemical solvents that match AR standards. Method: Using basic reactions in organic chemistry to semi-synthesize quercetin from rutin; Monitor reaction progress using thin layer chromatography (TLC); Check product purity by TLC and melting temperature measurement. Evaluate of semi-synthetic quercetin quality by HPLC method; Validate the quercetin quantification method according to ICH guidelines; Determine product structure through spectral analysis methods: mass spectrometry (MS); infrared (IR) spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$). **Results:** Semi-synthesized quercetin from rutin with a scale of 10.0g/batch, using a mixture of 96% ethanol/20% HCl (ratio 3:1), water bath temperature 80-90°C, in 2 hours, filtered to collect crude quercetin product. Survey of purification methods: using solvents (isopropanol, ethanol, dichloromethane), changing pH to obtain results: Purifying crude quercetin in two steps, (1): Changing pH gives pH fractionation results 4 for the product with a content of 99.8%, total impurities of 0.3%, meeting the requirements mentioned in the pharmacopoeia monograph; (2): Recrystallize in hot 96% ethanol at a ratio of 1:30. The overall process efficiency is about 47%, quercetin products meet the quality criteria required in the American pharmacopoeia monograph USP44. The quantitative method has been validated according to ICH guidelines. Quercetin structure was confirmed by spectroscopic analysis methods (IR, MS, NMR) and the spectral values were equivalent to references. **Conclusions:** A process for preparing quercetin has been developed to satisfy quality criteria according to the treatise of the American Pharmacopoeia USP44.

Keywords: quercetin, rutin, purification, pH modification, hydrolysis, HPLC.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Flavonoid là hợp chất tự nhiên được phân bố rộng rãi trong thực vật, có tác dụng chống oxy hóa, an thần, chống trầm cảm, chống co giật, chống tăng sinh, chống viêm, chống vi khuẩn, chống ung thư, bảo vệ tim mạch, hạ huyết áp, chống ung thư, trị đái tháo đường và hoạt động bảo vệ gan. Ngoài ra, flavonoid có tác dụng lên các enzym của động vật có vú như protein kinase, alpha-glucosidase và aldose reductase, từ đó điều chỉnh nhiều con đường truyền tín hiệu tế bào đã bị thay đổi trong điều kiện bệnh tật [1]. Một trong những polyphenol thuộc nhóm flavonoid được quan tâm lớn hiện nay là quercetin. Quercetin được phân loại là flavonol, một trong năm phân lớp của hợp chất flavonoid. Quercetin tồn tại trong nhiều loài cây thuốc và rau quả ở dạng tự do (aglycon) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều gốc đường khác nhau tạo thành các quercetinglycosid [1], và hầu hết lượng chất quercetin trong các thực phẩm đều ở dạng glycosid [2], [3], [4]. Quercetin được tìm thấy trong nhiều loại thực phẩm như táo, nho, hành, trà,... cũng như trong nhiều loại hạt, quả hạch, hoa, lá, và trong nhiều loại dược liệu như *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum*, *Sambucus canadensis*...

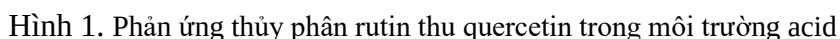
Với nhiều hoạt tính sinh học và tác dụng được lý tiềm năng nên quercetin đang là đối tượng được quan tâm nghiên cứu về quá trình chiết xuất [5], bán tổng hợp bằng phản ứng thủy phân rutin [6] trong nước và trên thế giới, tuy nhiên việc điều chế quercetin tinh khiết còn gặp nhiều khó khăn. Ở Việt Nam cũng đã có các nghiên cứu điều chế quercetin từ rutin bằng phản ứng thủy phân, tuy nhiên chưa có đánh giá đầy đủ chất lượng sản phẩm theo tiêu chuẩn dược dụng. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu: Xây dựng được quy trình điều chế quercetin từ rutin đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ USP 44.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng: Quercetin bán tổng hợp

Sử dụng phản ứng thủy phân cơ bản trong hóa học hữu cơ để bán tổng hợp quercetin: Cân 8 g rutin vào bình nón dung tích 250 mL. Sau đó, bổ sung 240 mL hỗn hợp ethanol 96%: acid hydrocloric 10% (tỷ lệ 3:1). Lắp sinh hàn, đun cách thủy ở 80-90°C trong bể điều nhiệt và thi thoảng khuấy, lắc nhẹ. Dùng SKLM để theo dõi quá trình thủy phân (so sánh với quercetin chuẩn). Khi sắc ký đồ hết vết rutin thì dừng phản ứng. Để kết tinh lạnh (5 - 8 °C) trong 24 h. Lọc lấy tủa. Nước cái thu hồi làm dung môi cho mẻ sau. Rửa tủa bằng nước cất cho tới khi nước rửa đạt pH trung tính và cho phản ứng âm tính với thuốc thử Fehling. Tủa thu được đem sấy khô, thu được quercetin thô theo sơ đồ phản ứng như Hình 1 sau:



Theo dõi tiến trình phản ứng bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) thực hiện trên bản mỏng mỏng silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) với các hệ dung môi khai triển: ethyl acetat: acid formic: H₂O= 8:1:1. Quan sát sắc ký đồ dưới bước sóng 254 nm của đèn tử ngoại. Phương pháp kết tinh để thu được quercetin thô. Đánh giá sơ bộ chất lượng quercetin thô bằng nhiệt độ nóng chảy, SKLM.

Phương pháp kết tinh lại trong các điều kiện khác nhau để tinh chế quercetin. Sản phẩm quercetin thu được được đánh giá chất lượng dựa trên định lượng hàm lượng quercetin và tạp chất trên sắc ký đồ bằng phương pháp HPLC. Các phương pháp sử dụng bao gồm: sử dụng ethanol, isopropanol, sử dụng dung môi hữu cơ (dicloromethan, ethanol) và kết tinh bằng thay đổi pH. Phương pháp HPLC đã được thẩm định phù hợp cho phép đo định lượng quercetin và giới hạn tạp chất.

Sản phẩm được kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, đo nhiệt độ nóng chảy và đánh giá hàm lượng, tạp chất bằng HPLC. Đo nhiệt độ nóng chảy: Nhiệt độ nóng chảy đo bằng máy đo nhiệt độ nóng chảy EZ- Melt (Mỹ). Đánh giá hàm lượng quercetin và tạp chất bằng HPLC. Các sản phẩm tổng hợp được xác định cấu trúc thông qua các số liệu phổ: phổ khối lượng (MS) được đo tại Viện Hóa học- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trên máy LC-MSD-Trap-SL (Agilent Technologies); phổ hồng ngoại (IR) trên máy Shimadzu với kỹ thuật ép viên nén kali bromid và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$) đo trên máy Bruker, dung môi DMSO, phổ $^1\text{H-NMR}$ đo tại tần số 500 MHz, phổ $^{13}\text{C-NMR}$ đo tại bước sóng 125 MHz tại khoa Hóa học- Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xây dựng được quy trình điều chế quercetin với quy mô phòng thí nghiệm

Quy trình bán tổng hợp quercetin:

Thực hiện quy trình bán tổng hợp quercetin từ rutin được trình bày trên mục 2.2, khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới quy trình như: giai đoạn trình xử lý dịch lọc, nồng độ acid HCl sử dụng, sử dụng nước cái cho quá trình thủy phân và giai đoạn tinh chế. Kết quả thu được như sau:

Khảo sát quy trình xử lý dịch lọc đến chất lượng sản phẩm:

Ngay sau khi dừng phản ứng, tiến hành lọc nóng dịch phản ứng để loại bỏ các tạp chất không tan.

Bảng 1. Khảo sát quá trình lọc dịch phản ứng

Quá trình lọc	Khả năng lọc	m (g)	H%	t ^o nóng chảy (°C)	Cảm quan
Không sử dụng lọc	X	3,64	91,9%	302,3- 305,4	Màu vàng nâu
Lọc qua giấy	Khó thu dịch lọc	X	X	X	X
Lọc bông	Dễ dàng thu dịch	3,44	86,9%	305,8- 309,5	Màu vàng nhạt

X: Không thực hiện, hoặc không đánh giá được dữ liệu

Nhận xét: Quá trình lọc làm tăng chất lượng sản phẩm, đồng thời tiết kiệm thời gian trong quá trình thu tủa.

Từ khảo sát: Thêm bước lọc nóng dịch phản ứng ngay sau khi dừng phản ứng để loại các tạp không tan trước khi bắt đầu quá trình kết tinh.

Khảo sát nồng độ acid HCl sử dụng:

Bảng 2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ acid đến phản ứng

TT	Nồng độ HCl	Thời gian (h)	m (g)	H%	T ^o _{nc} (°C)	Cảm quan
1	5%	3,5 h	3,00 g	75,8%	305,5- 309,8	Tủa có màu vàng nhạt
2	10%	2,5 h	3,57 g	90,1%	306,0- 309,1	Tủa có màu vàng nhạt
3	20%	2 h	3,44 g	86,9%	305,8- 309,5	Tủa có màu vàng đậm

Khảo sát sử dụng nước cái cho quá trình thủy phân:

Bảng 3. Kết quả của việc sử dụng nước cái cho phản ứng

STT	Thời gian (h)	m (g)	H%	T ^o nóng chảy	Cảm quan
HCl 10%	3 h	3,57 g	90,1%	306,0- 309,1	Tủa màu vàng nhạt
Nước cái lần 1	3 h 15 p	3,79 g	95,7%	305,8-309,2	Tủa màu vàng nhạt
Nước cái lần 2	3 h 15 p	3,82 g	96,5%	305,9-309,3	Tủa màu vàng nhạt

Việc tái sử dụng nước cái là hoàn toàn hiệu quả và có thể dùng để ứng dụng trong sản xuất để tiết kiệm chi phí, bảo vệ môi trường mà vẫn thu được hiệu quả cao.

Quy trình tinh chế:

Khảo sát các phương pháp tinh chế quercetin sử dụng dung môi (ethanol, isopropanol, hỗn hợp dung môi hỗn hợp dicloromethan - ethanol) và thay đổi pH, thu được quy trình tinh chế quercetin đạt tiêu chuẩn được diễn như sau:

Giai đoạn 1: Hòa tan quercetin thô trong dung dịch Na₂B₄O₇ 2% theo tỷ lệ 1:50. Lọc lấy dịch trong. Điều chỉnh pH bằng dung dịch HCl 5%, theo dõi pH và quá trình tạo tủa theo các nấc pH 7, 6, 5, 4. Sau mỗi nấc tiến hành lọc thu tủa, dịch trong được tiến hành điều chỉnh pH đến mức pH kế tiếp. Quercetin tinh khiết được thu ở pH 4. Tủa được rửa bằng nước cất đến pH trung tính. Sấy tủa ở 60°C trong 3h. Kiểm tra bán thành phẩm hàm lượng quercetin và giới hạn tạp chất bằng phương pháp HPLC.

Giai đoạn 2: Hòa tan tủa thu được trong ethanol 96% nóng theo tỷ lệ 1:30. Lọc nóng lấy dịch trong. Để nguội, thêm nước theo tỷ lệ 1:1. Kết tinh lạnh qua đêm. Lọc thu lấy tủa, sấy ở 60°C trong 3h.

Sau khi khảo sát quy trình bán tổng hợp và tính chất quercetin thu được quy trình điều chế quercetin với quy mô phòng thí nghiệm như sau:

Cho 8 g rutin vào bình nón dung tích 250 mL. Sau đó, bổ sung 240 mL hỗn hợp ethanol 96%: acid hydrochlorid 10% (tỷ lệ 3:1). Lắp sinh hàn, đun cách thủy ở 80-90°C trong bể điều nhiệt và thi thoảng khuấy, lắc nhẹ. Dùng SKLM để theo dõi quá trình thủy phân (so sánh với quercetin chuẩn). Khi sắc ký đồ hết vết rutin thì dừng phản ứng. Để kết tinh trong 24-48h. Lọc lấy tủa. Nước cái thu hồi làm dung môi cho mẻ sau. Rửa tủa bằng nước cất cho tới khi nước rửa đạt pH trung tính và cho phản ứng âm tính với thuốc thử Fehling. Tủa thu được đem sấy khô, thu được quercetin thô.

Hòa tan quercetin thô trong dung dịch $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 2% theo tỷ lệ 1:50. Lọc lấy dịch trong. Điều chỉnh pH bằng dung dịch HCl 5%, theo dõi pH và quá trình tạo tủa theo các nấc pH 7, 6, 5, 4. Sau mỗi nấc tiến hành lọc thu tủa, dịch trong được tiến hành điều chỉnh pH đến mức pH kế tiếp. Quercetin tinh khiết được thu ở pH 4. Tủa được rửa bằng nước cất đến pH trung tính. Sấy tủa ở 60°C trong 3h. Hòa tan tủa thu được trong ethanol 96% nóng theo tỷ lệ 1:30. Lọc nóng lấy dịch trong. Để nguội, thêm nước theo tỷ lệ 1:1. Kết tinh lạnh qua đêm. Lọc thu lấy tủa, sấy ở 60°C trong 3h.

Hiệu suất toàn quy trình khoảng 47%, sản phẩm quercetin đạt các chỉ tiêu chất lượng được yêu cầu trong chuyên luận dược điển Mỹ USP 44.

3.2. Đánh giá chất lượng sản phẩm

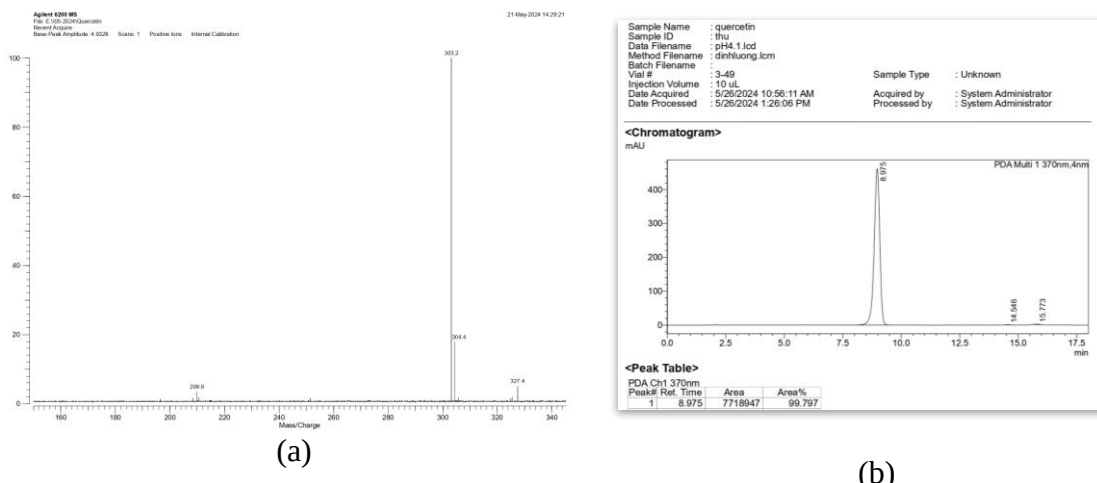
Xác định cấu trúc: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): 12,50 (1H, s, HO-C5); 10,79 (1H, s, HO-C7); 9,60 (1H, s, HO-C4'); 9,38 (1H, s, HO-C3); 9,32 (1H, s, HO-C3'); 7,69 (1H, d, *J*=2,5 Hz, H-2'); 7,56 (1H, dd, *J*₁=2,0 Hz, *J*₂=8,0 Hz, H-6'); 6,89 (1H, d, *J*=8,5 Hz, H-5'); 6,42 (1H, d, *J*=2,0 Hz, H-8); 6,20 (1H, d, *J*=2,0 Hz, H-6). ¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz): 176,30 (C-4); 164,34 (C-7); 161,19 (C-5); 156,59 (C-8a); 148,16 (C-2); 147,26 (C-4'); 145,52 (C-3'); 136,20 (C-3); 122,41 (C-1'); 120,47 (C-6'); 116,06 (C-5'); 115,52 (C-2'); 103,48 (C-4a); 98,67 (C-6); 93,87 (C-8). MS (ESI, *m/z*): 303,2 [M+H]⁺. IR: 3403 cm⁻¹ (-OH phenol), 1664 cm⁻¹ (C=O), 1609 cm⁻¹, 1560 cm⁻¹, 1521 cm⁻¹ (C=C nhân thơm) và 1260 cm⁻¹, 1197 cm⁻¹, 1167 cm⁻¹, 1092 cm⁻¹ (C-O) phù hợp với cấu trúc phân tử dự kiến của quercetin.

Kết quả kiểm tra chất lượng quercetin sản phẩm theo tiêu chuẩn dược điển Mỹ USP 44: Bảng 4. Kết quả kiểm tra chất lượng quercetin

Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
Phổ hồng ngoại	Trùng với phổ chuẩn hoặc phổ của chất chuẩn	Đạt
Quang phổ UV	Cực đại hấp thụ tại 2 bước sóng 255 nm và 371 nm. Độ hấp thụ tại bước sóng 371 nm với mẫu thử 10 µg/mL nằm trong khoảng 75-80.	Đạt
Tro toàn phần	Không quá 0,1%	Đạt (0,095%)
Lượng nước	Không quá 12%	Đạt (9,9%)
Định lượng	Hàm lượng quercetin: 98,0% - 102,0%	Đạt (99,8%)
Giới hạn tạp chất	Kaempferol không quá 0,5%, tạp chất riêng lẻ: không quá 0,1%, tổng tạp chất: không quá 2,0%.	Đạt (không có tạp đơn nào quá 0,1%)

Sản phẩm quercetin điều chế được đạt các chỉ tiêu chất lượng được yêu cầu trong chuyên luận Quercetin của dược điển Mỹ USP 44.

Một số dữ liệu đại diện được trình bày dưới đây (Hình 2):



Hình 2. Phổ MS (a) và sắc ký đồ HPLC của sản phẩm quercetin (b)

IV. BÀN LUẬN

Sau các khảo sát điều kiện phản ứng, quy trình bán tổng hợp quercetin từ rutin trong nghiên cứu có sử dụng điều kiện phản ứng đơn giản, dễ thực hiện, dễ nâng quy mô, quy trình ổn định với hiệu suất khá cao, tiết kiệm được dung môi. Quá trình tinh chế thay đổi pH và kết tinh phân đoạn ở pH 4 cho sản phẩm quercetin đạt các chỉ tiêu chất lượng theo yêu cầu của dược điển Mỹ USP 44. Quy trình tinh chế trên chưa từng được sử dụng trong các nghiên cứu trước đây. Tuy cho hiệu suất tinh chế chưa cao, phân đoạn pH 5 chưa đạt yêu cầu về hàm lượng và giới hạn tạp chất, nhưng có thể khắc phục bằng cách đồng nhất và tinh chế lại để tận dụng được sản phẩm.

Sau các quá trình khảo sát, các thông số chính đã được lựa chọn như sau: Xúc tác: acid HCl 10%; Dung môi phản ứng: EtOH 96%; Tỷ lệ EtOH 96%: dung dịch HCl 10%: 3:1; Gia nhiệt cách thủy ở 80-90°C; Kết thúc phản ứng lọc nóng thu lấy dịch trong; Tái sử dụng nước cái cho mẻ phản ứng sau. Phương pháp mới để tinh chế quercetin đã được khảo sát và xây dựng: kết hợp phương pháp thay đổi pH, kết tinh phân đoạn bằng dung dịch $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 2% và HCl 5%, sử dụng EtOH 96% và nước tỷ lệ 1:1 để tinh chế lại sản phẩm.

Quy trình tinh chế trên chưa từng được công bố trên các nghiên cứu trước đây. Quy trình có nhiều ưu điểm hơn so với phương pháp tinh chế bằng sắc ký (phương pháp tinh chế phổ biến để phân lập các chất tinh khiết làm chất chuẩn) như: có khả năng nâng quy mô, tiết kiệm và sử dụng dung môi xanh là ethanol 96%.

Sản phẩm quercetin được đánh giá cấu trúc dựa trên các kết quả phổ đặc trưng và kiểm tra, đánh giá các chỉ tiêu chất lượng theo yêu cầu của chuyên luận Quercetin trong dược điển Mỹ USP 44 (Bảng 5).

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình điều chế quercetin đạt các chỉ tiêu chất lượng theo chuyên luận của dược điển Mỹ USP 44, trong đó hàm lượng quercetin đạt 99,8% (tính theo lượng khan) và giới hạn tạp chất đạt theo yêu cầu của chuyên luận (tổng tạp: 0,2-0,3%, các tạp đơn không quá 0,1%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lakhanpal P., Rai DK. Quercetin: A Versatile Flavonoid, *Internet Journal of Medical Update*, 2007.2 (2), 22-37, <http://doi.org/10.4314/ijmu.v2i2.39851>.
 2. D'Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?, *Fitoterapia*, 2015.106, 256-271, <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018>.
 3. Naidu N, Biyani D, Umekar M, Burley V. An Overview of a Versatile Compound: Quercetin, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2021.69, 248-257, <http://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v69i01.036>.
 4. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity, *Nutrients*, 2016.8(3), 167, <http://doi.org/10.3390/nu8030167>.
 5. Savic IM, Nikolic VD, Savic-Gajic IM, Nikolic LB, Moder K et al., Optimization of Quercetin Extraction from Green Tea (*Camellia sinensis*) Using Central Composite Design, and the Pharmacological Activity of the Extract, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2016.30, 103-115, <http://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2166>.
 6. Wang J, Zhao LL, Sun GX, Liang Y, Wu FA, et al., A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin, *African Journal of Biotechnology*, 2011. 10(8), pp. 1460-1466, <http://doi.org/10.5897/AJB10.2077>.
-