

大孔吸附树脂法去除山银花总皂苷的工艺研究

陈志华¹, 时港洪², 田海妍¹, 江仁望^{1*}

¹暨南大学中药与天然药物研究所, 广州 510632; ²香港大学微生物学系, 香港 999077

摘要: 本文采用大孔吸附树脂法对山银花总皂苷的去除工艺进行了研究。以山银花总皂苷含量为指标, 比较了 4 种大孔树脂对山银花总皂苷的吸附和解吸附性能, 并对优选出的树脂进行吸附工艺参数的优化。结果表明, HPD-100 型大孔树脂具有较好的吸附性能, 其最佳吸附工艺条件为: 药液上样浓度 0.65 g/mL, 流速 2 mL/min, 药液 pH 值为 4, 吸附 12 h。经蒸馏水和 30% 乙醇洗脱各 5 BV 后, 收集两者的洗脱液, 总皂苷去除率和总咖啡酰奎宁酸富集率均接近 90%, 确定了本实验所建立的方法能有效去除山银花总皂苷, 富集总咖啡酰奎宁酸。

关键词: 山银花; 大孔树脂; 总皂苷; 吸附

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.025

Removal Technology of Total Saponins from *Lonicerae Flos* by Macroporous Resin

CHEN Zhi-hua¹, SZE Kong-hung², TIAN Hai-yan¹, JIANG Ren-wang^{1*}

¹Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

²Department of Microbiology, Hong Kong University, Hong Kong 999077, China

Abstract: This study focused on the removal of total saponins and the enrichment of total caffeoylquinic acids from *Lonicerae Flos* using macroporous adsorption resin. The adsorption and desorption capacities for total saponins of 4 resins were compared. The adsorption characters, the elution parameters and the influencing factors of the selected macroporous resin were optimized. The results demonstrated that HPD-100 macroporous resin possessed superior adsorptive and desorptive properties on total saponins than the other 3 resins. The optimized conditions were as follows: the sample concentration was 0.65 g/mL, the flow rate was 2 mL/min, the pH value was 4, the adsorption time was 12 h, and the elution reagents were 5 BV of water and 5 BV of 30% ethanol. Under the optimized conditions, both the removal ratio of total saponins and enrichment ratio of total caffeoylquinic acids were closed to 90%, indicating that the removal technology of this study can significantly decrease the content of total saponins and enrich the caffeoylquinic acids in *Lonicerae Flos*.

Key words: *Lonicerae Flos*; macroporous resin; total saponins; adsorption

山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬 (*Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.)、华南忍冬 (*Lonicera confuse* DC.)、红腺忍冬 (*Lonicera hypoglauca* Miq.) 或黄褐毛忍冬 (*Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng) 的干燥花蕾或带初开的花。具有疏散风热, 清热解毒的功效, 主要用于温热发病、风热感冒、痈肿疔疮、热毒血痢^[1]。一方面, 山银花中含有含量较高的具有抗病毒作用的咖啡酰奎宁酸类成分^[2,3]; 另一方面, 山银花也含有大量的皂苷类成分。据报道^[4], 山银花中绿原酸占 3.309% ~

5.657%, 川续断皂苷乙和灰毡毛忍冬皂苷乙总量占 5.59% ~ 9.29%。山银花来源有 4 个品种, 资源分布广泛, 主要集中于广东、广西、湖北、福建、湖南等地^[5]。因此, 充分利用山银花资源, 显得尤为重要。为了去除山银花中的皂苷类成分, 并且富集到具有抗病毒作用的咖啡酰奎宁酸类成分, 本文比较了不同型号大孔树脂对总皂苷的吸附性能, 并对吸附效果好的树脂进行吸附工艺参数优化, 为山银花抗病毒注射剂的研发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

龙腾 ESJ182-4 十万分之一分析天平 (沈阳龙腾电子有限公司); T6 系列紫外可见分光光度计 (北京

收稿日期: 2016-05-23 接受日期: 2016-07-04

基金项目: 广东省新药创新重大专项 (2013A022100029)

* 通讯作者 Tel: 86-20-85221016; E-mail: rwjiang2008@126.com

普析通用仪器有限责任公司);恒温水浴锅(上海市百典仪器厂);分析型液相色谱仪 HPLC-DAD(美国安捷伦公司 1200 系列);KQ-100E 型台式机械超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司);101A-1 数显式鼓风干燥箱(上海谱振生物科技有限公司);HZQ-Q 全温空气恒温振荡器(广州市泉宏科学仪器有限公司);D101、HP20、HPD-100 和 AB-8 型大孔树脂购自天津南大树脂科技有限公司。

4 批山银花样品,样 1 产地广西(批号 20150304);样 2 产地湖南(批号 1404160429);样 3 产地广西(批号 20150501);样 4 产地湖南(批号 140601)。灰毡毛忍冬皂苷乙对照品(批号 13150304,纯度大于 98%,购自南京广润生物制品有限公司);新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品(批号分别为 15011412、14120115、14041410、14111411、14071507、14111414,纯度大于 98%,购自成都曼思特生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 大孔树脂的预处理以及含水量的测定

按常规方法处理后,取 4 种不同型号的树脂各一份,每份 2~3 g,精密称定后放入干燥至恒重的称量瓶中,于 105 °C 烘箱中干燥 5 h,直至恒重,计算重量差和含水率^[6]。

1.3 山银花水提液的制备

取山银花(样 1)药材制成粉末,过三号筛。精密称定 100 g 山银花样品粉末,置于圆底烧瓶中,加入蒸馏水 4 L,100 度加热回流,煎煮 7 h,冷却至室温,加入蒸馏水补充损失的重量,即得浓度为 0.025 g/mL 的药液。经浓缩,制成浓度分别为 0.125、0.25、0.39、0.52、0.65 g/mL 的药材浓缩液,低温保存放置,备用。药液 pH 为 4。

1.4 山银花水提液中总皂苷含量的测定^[7]

以一系列不同浓度的灰毡毛忍冬皂苷乙作为对照品溶液,置 10 mL 具塞试管中,以试剂溶液作为参比,水浴挥干溶剂后依次精密加入新配的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.6 mL,加塞混匀后在 70 °C 水浴恒温加热 30 min,立刻取出冰浴冷却,再加入 5 mL 冰醋酸稀释,摇匀,用紫外分光光度法在 477 nm 处分别测定吸光度(A),以吸光度为纵坐标,灰毡毛忍冬皂苷乙对照品溶液浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,绘制标准曲线,计算得到回归方程为 $A = 0.0263C + 0.0396$, $r = 0.9994$,线性范围为 5.172 ~

29.310 $\mu\text{g/mL}$ 。精密吸取 60 μL 山银花水提取液(0.025 g/mL),按相同的显色法测定总皂苷的吸光度,根据标准曲线计算出总皂苷的浓度。

1.5 山银花水提液中总咖啡酰奎宁酸的含量测定及色谱分析条件^[8]

浓度为 0.025 g/mL 的药液经过滤后按如下色谱条件进行测定。Welch Ultimate LP-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.05% 冰醋酸溶液(A)-甲醇(B);二元梯度洗脱(0~10 min, 10%~20% B; 10~18 min, 20%~35% B; 18~33 min, 35%~47% B; 33~35 min, 47%~100% B; 35~38 min, 100% B; 38~40 min, 100%~10% B; 40~43 min, 10% B);流速 1 mL/min;进样量 5 μL ;柱温为室温;检测波长 326 nm。以一系列不同浓度的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸混合对照品溶液用外标法作定量分析,以进样量(μg)为横坐标,以峰面积值(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程和线性范围分别为 $Y = 2893.3X - 127.88$ ($r = 0.9991$, 0.100~4.000 μg)、 $Y = 2850.3X - 470.83$ ($r = 0.9993$, 0.266~10.640 μg)、 $Y = 2752.1X - 284.8$ ($r = 0.9994$, 0.180~7.200 μg)、 $Y = 2707.9X - 107.49$ ($r = 0.9993$, 0.092~11.040 μg)、 $Y = 3082.8X - 236.2$ ($r = 0.9995$, 0.094~7.520 μg)、 $Y = 3148.3X - 215.67$ ($r = 0.9994$, 0.082~9.840 μg)。上述 6 种酸含量之和为总咖啡酰奎宁酸的含量。

1.6 工艺参数考察与优化^[9,10]

1.6.1 大孔树脂的筛选

1.6.1.1 大孔树脂对山银花总皂苷静态吸附率的测定

于 50 mL 具塞锥形瓶中分别加入 4 种已处理好的大孔树脂,精密称定,每份与相应的 1 g 干树脂相当,再精密加入山银花药液(0.25 g/mL) 20 mL,置 25 °C、120 rpm 的恒温摇床中静态吸附 12 h,测定吸附前后总皂苷的浓度,按公式 $Q = (C_0 - C_v) \times V/W$ 计算静态吸附量(mg/g);假设吸附前后溶液体积不变,按公式 $P(\%) = (C_0 - C_v) / C_0 \times 100\%$ 计算吸附率。式中 Q 为静态吸附量(mg/g), C_0 为初始皂苷浓度(mg/mL), C_v 为吸附后滤液中皂苷浓度(mg/mL),V 为溶液体积(mL),W 为树脂质量(g),P 为吸附率(%)。

1.6.1.2 大孔树脂对山银花总皂苷静态解吸率的测定

取 1.0 g 上述饱和吸附的大孔树脂,用蒸馏水洗至洗脱液无色,然后减压抽滤使树脂的表面无残留液体,加入 20 mL 50% 乙醇溶液,置 25 ℃、120 rpm 的恒温摇床中进行静态解吸 6 h,测定树脂滤出后滤液中总皂苷的浓度,假设实验前后溶液体积不变,按公式 $U = C \times V$ 计算解吸量,按公式 $Z(\%) = U / (Q \times W) \times 100\%$ 计算解吸率。式中 U 为解吸量(mg), Z 为解吸率(%), C 为解吸液的皂苷浓度(mg/mL), V 为解吸液的体积(mL), Q 为静态吸附量(mg/g), W 为树脂质量(g)。

1.6.2 大孔树脂吸附山银花总皂苷的影响因素

采用湿法装柱,将与 10 g 干树脂相当的大孔树脂置于 35 cm × 2.3 cm 规格的开放柱中,药液上样体积为 50 mL,进行动态吸附,考察不同的总皂苷浓度、洗脱液流速、药液 pH 值和吸附时间的最佳条件,然后依次加 6 BV 蒸馏水(水洗量)、6 BV 50% 乙醇进行洗脱(洗脱量),测定洗脱液中的总皂苷含量,按以下公式计算动态比吸附量和比解析率,优选最大的比吸附量和最小的比解吸率。

比吸附量(mg/g 干树脂) = (上样皂苷含量 - 流出量 - 水洗量) / 树脂克数

比解吸率(%) = 洗脱量 / (上样皂苷含量 - 流出量 - 水洗量)

1.6.3 动态吸附泄漏曲线

往装有相当于 10 g 干树脂的已完成预处理的树脂中缓缓加入浓度为 0.65 g/mL 的药液 200 mL,洗脱速度保持 2 mL/min,收集每 10 mL 流出液为 1 个流份,对每个流份中的总皂苷进行含量测定,记录,描绘出总皂苷的动态吸附泄漏曲线图。

1.6.4 洗脱溶媒的考察

往装有相当于 10 g 干树脂的已完成预处理的树脂中缓缓加入浓度为 0.65 g/mL 的药液 20 mL,吸附 12 h 后,依次用蒸馏水、15%、30%、50%、

70%、95% 乙醇洗脱,每个洗脱溶媒的用量为 4 BV,收集每 1 个柱体积的流出液为 1 个流份,对每个流份中的总皂苷进行含量测定,记录,描绘出不同浓度乙醇洗脱皂苷的曲线。

1.6.5 洗脱剂用量的考察

往装有相当于 10 g 干树脂的已完成预处理的树脂中缓缓加入浓度为 0.65 g/mL 的药液 20 mL,吸附 12 h 后,先用 8 BV 的蒸馏水洗脱,再用 8 BV 30% 乙醇进行洗脱,收集每 1 个柱体积的流出液为 1 个流份,对每个流份中的总皂苷进行含量测定,记录,并用 TLC 检测各洗脱液流份中的咖啡酰奎宁酸类成分。

1.7 山银花水提液中总皂苷的去除工艺验证试验^[11]

分别精密吸取 20 mL 4 批山银花药液(0.65 g/mL),每批各 2 份,其中 1 份按照考察的最佳条件上柱洗脱,富集水和 30% 乙醇洗脱液各 5BV,减压浓缩、冷冻干燥富集液和另 1 份药液,称定干燥后质量,对工艺处理前后的总皂苷和总咖啡酰奎宁酸含量进行测定,并计算总皂苷去除率和总咖啡酰奎宁酸富集率。此方法重复试验三次。

总皂苷去除率 = (上柱前样品中的总皂苷量 - 洗脱后洗脱液中的总皂苷量) / 上柱前样品的总皂苷量;总咖啡酰奎宁酸富集率 = 洗脱后洗脱液中的总咖啡酰奎宁酸 / 上柱前样品中的总咖啡酰奎宁酸。

2 结果与讨论

2.1 树脂含水量的测定

4 种不同型号的树脂含水量测定结果见表 1。实验结果显示,4 种树脂的含水率差异较大,因此在进行吸附和解吸附实验时,必须折算成干树脂的重量来计算。其中 HPD-100 型大孔树脂的含水率最高,D101 型大孔树脂的含水率最低。

表 1 不同型号树脂的含水率

Table 1 Water content of macroporous resins

树脂型号 Resin type	D101	HP-20	HPD-100	AB-8
含水率 Water content (%)	57.80	59.66	73.51	65.44

2.2 4 种大孔树脂的静态吸附和解吸性能比较

实验结果表明,4 种大孔树脂的吸附能力由强到弱依次为 HPD-100、HP20、AB-8、D101;解吸能力由强到弱依次为 D101、HP20、HPD-100、AB-8。

HPD-100 型大孔树脂对总皂苷的吸附能力最强,解吸率较小,优于其他三种类型的树脂,因此优选 HPD-100 型大孔树脂。具体结果见表 2。

表 2 4 种不同型号树脂对山银花总皂苷的静态吸附率和解吸率
Table 2 Adsorption and desorption rate of total saponins on four resins

树脂型号 Resin type	吸附量 Adsorption quantity (mg/g)	吸附率 Adsorption rate (%)	解吸量 Desorption quantity (mg)	解吸率 Desorption rate (%)
D101	170.90	40.454	116.18	67.974
HP20	202.26	47.863	128.08	63.337
HPD-100	222.10	52.563	132.94	59.862
AB-8	191.64	45.359	113.08	59.006

2.3 HPD-100 型大孔树脂吸附山银花总皂苷的影响因素考察结果

2.3.1 药液浓度的影响

维持药液 pH 值为 4 和 1.5 mL/min 的洗脱速度不变,测定当药液的浓度分别为 0.125、0.25、0.39、0.52、0.65 g/mL 时的比吸附量和比解吸率,结果见图 1。由图可知,随着浓度不断增大,比吸附量越大,比解吸率越小,但浓度太大会使药液变得粘稠,影响大孔树脂再生使用的次数,因此选择 0.65 g/mL 的药液浓度较为合适。

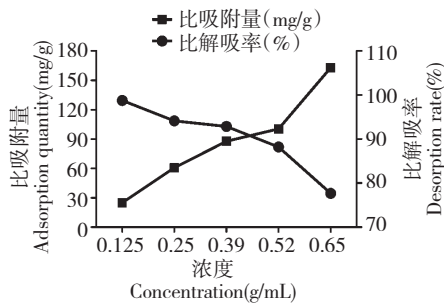


图 1 药液浓度对比吸附量、比解吸率的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of sample on adsorption and desorption

2.3.2 洗脱液流速的影响

维持药液 pH 值为 4 和 0.65 g/mL 的药液浓度不变,测定当洗脱液流速分别为 1、1.5、2、3、5 mL/min 时的比吸附量和比解吸率,结果见图 2。

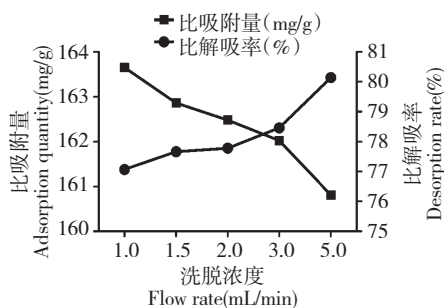


图 2 洗脱液流速对比吸附量、比解吸率的影响

Fig. 2 Effect of different flow rates on adsorption and desorption

min 时的比吸附量和比解吸率,选择最佳洗脱流速,结果见图 2。由图可知,当洗脱流速为 1 mL/min 时,比吸附量最大,比解吸率最小,但流速过慢会影响实验效率,而 1.5 mL/min 和 2 mL/min 的比吸附量和比解吸率相差不大,因此选择合适的洗脱速度为 2 mL/min。

2.3.3 药液 pH 值的影响

维持 2 mL/min 的洗脱流速和 0.65 g/mL 的药液浓度不变,用 1 N NaOH 和 1 N HCl 溶液调节药液的 pH 值分别为 3、4、6、7、8,测定当 pH 值不同时总皂苷的比吸附量和比解吸率。结果见图 3。由图可知,当药液 pH 值为 4 时的比吸附量最大, pH 值为 3 时的比解吸率最低,但 pH 值为 4 和 pH 值为 3 时的比解吸率相差不大,因此选用 pH 值为 4,即为药液本身的 pH,无需调试。

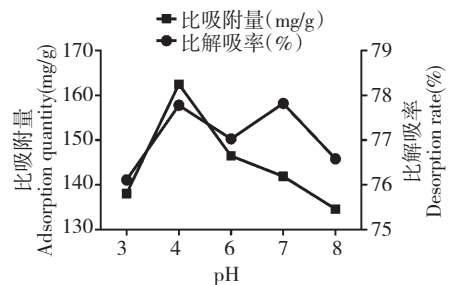


图 3 药液 pH 值对比吸附量、比解吸率的影响

Fig. 3 Effect of different pH values on adsorption and desorption

2.3.4 药液吸附时间的影响

维持洗脱速度为 2 mL/min 和药液浓度为 0.65 g/mL (pH = 4) 不变,使吸附时间分别为 1、4、8、12、24 h,考察不同吸附时间的比吸附量和比解吸率。结果见图 4。由图可知,随着吸附时间不断增长,比吸附量逐渐增大,比解吸率逐渐减少,但从 12 h 开始,比吸附量增大和比解吸率减少的速率非常缓慢,

接近平缓,说明已经达到吸附饱和,因此选择吸附时间为 12 h。

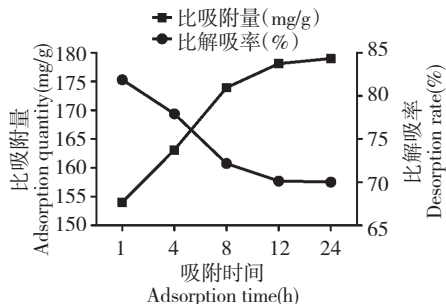


图4 吸附时间对比吸附量、比解吸率的影响

Fig. 4 Effect of different adsorption time on adsorption and desorption

2.4 动态吸附泄漏曲线

测试结果见图 5。由图可知,前两个流份几乎没有检测出总皂苷,但从第三份开始出现泄漏。因此,质量浓度为 0.65 g/mL、上样体积为 20 mL 的山银花药液可以被 HPD-100 型大孔树脂基本吸附,相当于 1.3 g 山银花药材能被 1 g HPD-100 型大孔树脂吸附,且吸附容量为 2 mL。

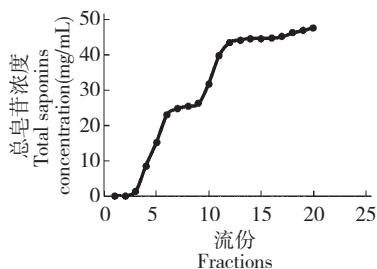


图5 山银花总皂苷的动态吸附泄漏曲线

Fig. 5 Dynamic adsorption curve of total saponins

2.5 洗脱溶媒的确定

测试结果见图 6。由图可知,蒸馏水、15% 和 30% 的乙醇洗脱液中总皂苷含量较少,总皂苷主要集中在 50% ~ 95% 的乙醇洗脱部分。且每个流份经 TLC 检测,发现咖啡酰奎宁酸类成分也主要集中在

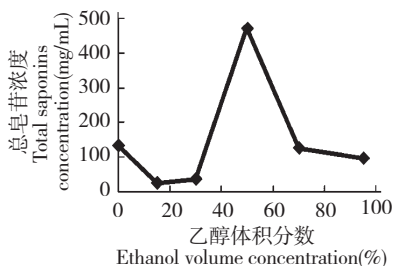


图6 乙醇体积分数对总皂苷洗脱效果的影响

Fig. 6 Effect of ethanol concentrations on elution of total saponins

在蒸馏水和 30% 以下的乙醇洗脱液中。因此,依次用水和 30% 乙醇溶液作为洗脱液,可以富集到具有抗病毒活性的咖啡酰奎宁酸类成分,而总皂苷几乎没有被洗脱下来,被吸附于大孔树脂上。

2.6 洗脱剂用量的确定

测试结果见图 7。由图可知,经大孔树脂吸附后,16 个流份中的总皂苷含量很少。蒸馏水洗脱的第 6、7、8 个流份和 30% 乙醇洗脱的第 6、7、8 个流份经 TLC 检测,发现其含咖啡酰奎宁酸类成分较少,因此确定洗脱剂用量为先用蒸馏水洗脱 5 BV,再用 30% 乙醇洗脱 5 BV。将两者收集浓缩后,即为洗脱后样品。

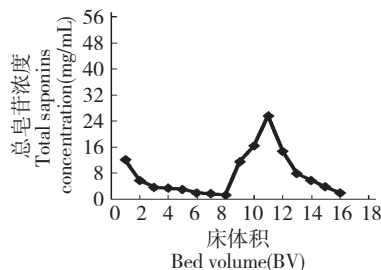


图7 16 个洗脱液流份中总皂苷的含量变化曲线

Fig. 7 Total saponins content curve of 16 elution fractions

2.7 山银花水提液中总皂苷的去除工艺验证试验结果

测试结果见表 3 和图 8。由表图数据可知,HPD-100 型大孔树脂经蒸馏水和 30% 乙醇洗脱后,总皂苷去除率和总咖啡酰奎宁酸富集率均接近 90%,可见以 HPD-100 型大孔吸附树脂工艺处理前后的总皂苷和总咖啡酰奎宁酸含量为指标,可证明大孔吸附树脂法能将山银花中总皂苷和总咖啡酰奎宁酸分离开来,实现总咖啡酰奎宁酸的富集和总皂苷的去除。

3 结论

本研究前期考察了阴离子交换树脂、中性氧化铝和大孔树脂对山银花总皂苷的吸附能力,结果显示大孔树脂对皂苷的吸附能力最佳,其他两种材料的吸附能力较弱,不能全面去除皂苷。因此,本研究为了建立大孔树脂吸附山银花总皂苷和富集总咖啡酰奎宁酸的方法,首先对不同类型的树脂进行筛选,然后考察不同的药液质量浓度、洗脱液流速、药液 pH 值和吸附时间对总皂苷吸附的影响。

考察结果表明,HPD-100 型大孔树脂对总皂苷

表3 4批山银花总皂苷去除率和总咖啡酰奎宁酸富集率结果

Table 3 Removal ratio of total saponins and enrichment ratio of total caffeoylquinic acids of four batches of *Lonicerae Flos*

样品 Sample	状态 Station	总皂苷 Total saponins (mg)	总咖啡酰奎宁酸 Total caffeoylquinic acids (mg)	总皂苷去除率 Removal ratio of total saponins (%)	总咖啡酰奎宁酸富集率 Enrichment ratio of total caffeoylquinic acids (%)	总皂苷/总咖啡 酰奎宁酸 Total saponins/ total caffeoylquinic acids
样1	上柱前	1098.5	174.23	-	-	6.30
	洗脱后	94.711	157.17	91.38	90.21	0.60
样2	上柱前	2770.3	1404.0	-	-	1.97
	洗脱后	306.42	1273.4	88.94	90.70	0.24
样3	上柱前	2603.9	622.85	-	-	4.18
	洗脱后	260.40	573.59	90.00	92.09	0.45
样4	上柱前	2736.5	754.95	-	-	3.62
	洗脱后	317.30	708.85	88.40	93.89	0.45

注:1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 隐绿原酸 4. 3,4-二咖啡酰奎宁酸 5. 3,5-二咖啡酰奎宁酸 6. 4,5-二咖啡酰奎宁酸。

Note: 1. 5-caffeoylquinic acid, 2. chlorogenic acid, 3. 4-caffeoylquinic acid, 4. 3,4-O-dicaffeoylquinic acid, 5. 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 6. 4,5-O-dicaffeoylquinic acid.

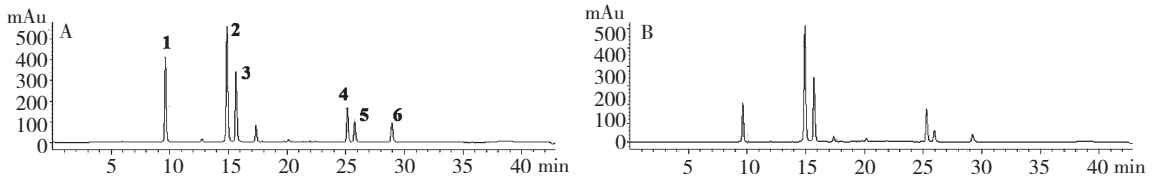


图8 样2山银花工艺处理前(A)、后(B)的HPLC色谱图

Fig. 8 HPLC chromatograms of *Lonicerae Flos* (S2) before (A) and after treatment by macroporous resin

的吸附能力较强,为优选的树脂。最佳吸附工艺条件为药液上样浓度0.65 g/mL,流速2 mL/min,药液pH值为4,吸附12 h。最后通过工艺验证试验,HPD-100型大孔树脂经5 BV蒸馏水和5 BV 30%乙醇洗脱后,收集两者的洗脱液,总皂苷去除率和6种有机酸富集率均接近90%,确定了本实验所建立的方法能把两类不同的化学成分分离开来,能有效去除山银花中的总皂苷,富集具有抗病毒活性的总咖啡酰奎宁酸。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 28.
- Ooi LSM, Wang H, He Z, et al. Antiviral activities of purified compounds from *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *J Ethnopharmacol*, 2006, 106: 187-191.
- Li YL, But PP, Ooi VE. Antiviral activity and mode of action

of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin. *Antiviral Res*, 2005, 68(1): 1-9.

- Li HX (李红霞), Wang XQ (王雪芹), Li ZG (李振国), et al. Content comparison of main compounds in *Lonicera japonica* and Flos *Lonicerae* from different producing areas. *China Pharm* (中国药房), 2011, 22: 2935-2937.
- Xue HW (薛红卫), Zhou CF (周超凡). Rational application of *Lonicera japonica* Flos and *Lonicera* Flos. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2011, 20: 2211-2214.
- Liu JB (刘江波), Fu TT (傅婷婷), Lv XY (吕秀阳). Separation and purification process of total flavones from *Radix tetrastigmae* with macroporous resins. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2011, 46: 287-292.
- Hong K (洪奎). Preparation process and manufacture procedure of *Vaccaria segetalis* total saponins. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), MSc. 2013.
- Hou JJ, Wu WY, Da J, et al. Ruggedness and robustness of conversion factors in method of simultaneous determination of multi-components with single reference standard. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 5618-5627.