

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201705035

引文格式: 王跃峰, 冯旭, 苏健, 等. 广西产拳卷地钱 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 广西植物, 2018, 38(5): 577-582

WANG YF, FENG X, SU J, et al. HPLC fingerprint of *Marchantia convoluta* in Guangxi [J]. *Guihaia*, 2018, 38(5): 577-582

## 广西产拳卷地钱 HPLC 指纹图谱研究

王跃峰<sup>1</sup>, 冯旭<sup>2</sup>, 苏健<sup>2</sup>, 傅鹏<sup>2</sup>, 邱骥鹏<sup>2</sup>, 朱华<sup>2,3\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 广西中医药大学, 南宁 530200; 3. 广西民族大学, 南宁 530006)

**摘要:** 为了对广西产拳卷地钱药材进行质量控制, 采用 HPLC 指纹图谱法对 8 批药材进行了研究, 色谱条件为安捷伦 ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (B) - 0.1% 磷酸水溶液 (D), 梯度洗脱, 检测波长为 230 nm, 柱温为 25 °C。结果表明: 建立了参考指纹图谱, 共有峰 6 个, 8 批广西产拳卷地钱药材 HPLC 指纹图谱相似度均大于 0.75, 其精密性、重复性、稳定性实验均符合指纹图谱技术要求。HPLC 指纹图谱分析, 数据稳定可靠, 方法简便高效, 可为广西产拳卷地钱质量评价提供参考。

**关键词:** 广西, 拳卷地钱, HPLC, 指纹图谱

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)05-0577-06

## HPLC fingerprint of *Marchantia convoluta* in Guangxi

WANG Yuefeng<sup>1</sup>, FENG Xu<sup>2</sup>, SU Jian<sup>2</sup>, FU Peng<sup>2</sup>, QIU Jipeng<sup>2</sup>, ZHU Hua<sup>2,3\*</sup>

(1. *Chengdu University of TCM*, Chengdu 610075, China; 2. *Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530200, China; 3. *Guangxi University for Nationalities*, Nanning 530006, China)

**Abstract:** In order to control the quality of *Marchantia convoluta*, we adopted HPLC fingerprint method to study eight batches of medicinal materials. The separation was developed on ZORBAX SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution with acetonitrile-water (both containing 0.1% phosphoric acid) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, at the column temperature of 25 °C and with the detection wavelength of 230 nm. The reference fingerprints were established, and six common peaks were found. The similarity of HPLC fingerprints of eight batches of *M. convoluta* was greater than 0.75. The precision, repeatability and stability of the experiments were in line with the requirements. The data of HPLC fingerprint analysis are stable and reliable. The method is simple and efficient, which can provide reference for the quality control of *M. convoluta*.

**Key words:** Guangxi, *Marchantia convoluta*, HPLC, fingerprint

收稿日期: 2017-09-13

基金项目: 国家自然科学基金 (81260620); 壮瑶药协同创新中心 (桂教科研 [2013] 20 号); 广西壮瑶药重点实验室 (桂科基字 [2014] 32 号); 广西重点学科壮药学 (桂教科研 [2013] 16 号); 八桂学者中药创新理论与药效研究 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (NSFC) (81260620); Collaborative Innovation Center for Zhuang and Yao Medicines ([2013] 20); Guangxi Key Laboratory of Zhuang Medicine ([2014] 32); Guangxi Key Discipline of Zhuang Medicine ([2013] 16); Studies of Bagui Scholars on Innovation Theory and Efficacy of TCM]。

作者简介: 王跃峰 (1971-), 男, 河北安平人, 博士, 工程师, 主要从事中药资源、品种及质量鉴定研究, (E-mail) 386787473@qq.com。

\* 通信作者: 朱华, 教授, 博士, 主要从事中药品种、品质及资源开发研究工作, (E-mail) zhuhuagx@163.com。

广西产拳卷地钱(*Marchantia convoluta*)是地钱科地钱属植物,是苔藓植物中常见的中草药之一,始载于《西藏苔藓植物志》,广泛分布在西藏、广西、贵州等省(区)的高寒山区。广西境内广泛分布多种地钱属植物,其中拳卷地钱的资源尤为丰富,作为常用草药在广西壮族民间得到广泛应用。民间用于烫伤骨折、疮病不敛、体癣等外科疾病其疗效不错,特别是治疗黄疸性肝炎显示出了很好的效果。国内外关于拳卷地钱研究主要是生药学鉴别研究(朱华等,2013;邹登峰等,2005)、挥发性成分(曹慧等,2005a,b;肖建波等,2005)、黄酮类化合物研究(朱华等,2005a;肖建波等,2005;童星等,2008)、芹菜素含量测定(朱华等,2005b)及脂溶性成分(朱华等,2003;肖建波,2005)分析、抗急性肝损伤及抗乙肝病毒药理研究(王跃峰等,2017)及ISSR-PCR扩增体系研究(周雨晴等,2014),但未见拳卷地钱 HPLC 指纹图谱的研究。

近年来,中药指纹图谱在中药质量控制方面得到了广泛应用,如罗汉果祛痰作用的谱效关系(王勤等,2017),裸花紫珠的 HPLC 指纹图谱研究(刘幼娴等,2014)等例子屡见不鲜,使之成为一种能为国内外广泛接受的中药质量评价模式,符合中药多数以复方和多成分给药的特点,能较好地评价中药及其制药过程的真实性、稳定性和一致性,而 HPLC 指纹图谱在各种指纹图谱中应用最广,具有分离效能高、分析速度快、仪器自动化强等特点,使 HPLC 指纹图谱技术在中药制药过程的质量控制中得到不断推广(徐益清等,2016;陈菊,2008)。目前关于广西产拳卷地钱质量评价仅见于紫外分光光度法测定总黄酮及 HPLC 法测定芹菜素含量的研究,为合理地开发利用拳卷地钱药用资源,保证药材的质量,完善质量控制标准,该研究采用 HPLC 法对广西产 8 批拳卷地钱进行指纹图谱分析,为药材鉴定及质量评价提供实验数据,为后期资源开发利用提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

药材采自广西各地,经生药学专家韦松基教

授鉴定为地钱科地钱属植物拳卷地钱(*Marchantia convoluta*),详见表 1。样品低温干燥后,粉碎并统一过 40 目筛,备用。

表 1 8 批地钱药材指纹图谱的相似度

Table 1 Similarity of fingerprints for eight batches of *Marchantia convoluta*

编号 Code	产地 Place of origin	采集时间 Acquisition time	相似度 (对照) Similarity (Comparison)
S1	河池都安 Du'an, Hechi	2017-03-27	0.807
S2	南宁高峰林场 Gaofeng forest, Nanning	2017-03-28	0.828
S3	桂林 Guilin	2017-03-27	0.943
S4	来宾金秀 Jinxiu, Laibin	2017-03-27	0.871
S5	南宁马山 Mashan, Nanning	2017-03-29	0.840
S6	钦州浦北 Pubei, Qinzhou	2017-03-29	0.774
S7	南宁上林 Shanglin, Nanning	2017-03-27	0.919
S8	南宁武鸣 Wuming, Nanning	2017-03-28	0.843

甲醇(色谱纯,赛默飞世尔,批号为 1205510);乙腈(色谱纯,赛默飞世尔,批号为 6116455);其余试剂为分析纯;水为超纯水。

Agilent 1260 高效液相色谱仪含可变波长检测器(G-1315D)、标准自动进样器(G-1329B)、高压四元泵(G-1311C)、智能化柱温箱(G-1316A)、在线真空脱气机(G-1311C)、Agilent 1260 series 色谱工作站(美国 Agilent);高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂,型号为 TGL-16B);超声仪(上海必能信超声有限公司,型号为 B2200S-T);电子分析天平(德国赛多利斯公司,型号为 BP211D)。

### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为安捷伦 ZORBAX SB-C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈(B)-0.1%磷酸水溶液(D),梯度洗脱,5%→5%B(0~5 min),5%→100%B(5~60 min),100%→100%B(60~80 min);流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>;检测波长为

230 nm;柱温为 25 ℃;进样量为 20 μL。

1.2.2 供试品溶液制备 精密称定地钱药材 1.0 g, 置具塞锥形瓶中,精密移取甲醇溶液 25 mL 加入, 称定重量,超声处理 60 min,冷却至室温,再精密称定重量,用提取溶剂补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,然后取滤液过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得供试品溶液。

### 1.2.3 方法学考察

1.2.3.1 精密密度考察 精密称定地钱药材 1.0 g,按“1.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“1.2.1”色谱条件下连续测定 6 次,分析实验数据,6 个共有峰相对保留时间 RSD<0.15%。相对峰面积 RSD<2.33%,实验结果表明该仪器的精密密度良好。

1.2.3.2 稳定性试验 取地钱药材 1.0 g,精密称定,按“1.2.2”项下方法制备成供试品溶液,分别在溶液制备的 0、2、4、8、10、12 h 进样分析。结果显示图谱无明显变化,重叠性良好。6 个共有峰相对保留时间 RSD 均<0.36%,6 个共有峰的相对峰面

积 RSD 均<3.33%,表明供试品溶液在室温下 12 h 内稳定。

1.2.3.3 重复性试验 取地钱药材 6 份,每份 1.0 g,精密称定,按“1.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“1.2.1”色谱条件进行洗脱分析。结果显示 8 批样品图谱无明显变化,6 个共有峰相对保留时间 RSD 均<0.18%。相对峰面积 RSD 均<3.34%,表明该方法的重复性良好、适合作为该样品指纹图谱实验。

### 1.2.4 指纹图谱的建立及相似度分析

1.2.4.1 指纹图谱的建立 取 8 批样品,精密称取 1.0 g,按“1.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“1.2.1”色谱条件进行洗脱分析,记录 HPLC 图。《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012.1 版软件分析,采用平均数相关系数法对 8 批拳卷地钱指纹图谱的色谱峰进行了多点校正及自动匹配,以(S2)的指纹图谱为参照指纹图谱,生成对照指纹图谱 R,并建立 8 批拳卷地钱药材的指纹图谱,见图 1。

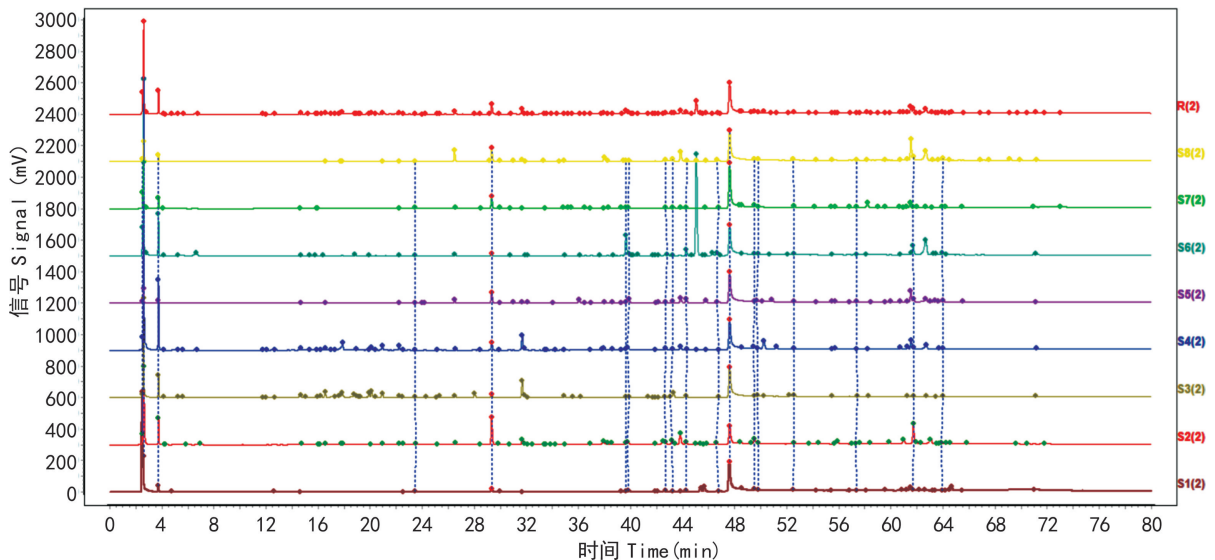


图 1 8 批地钱药材的指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint for eight batches of *Marchantia convoluta*

1.2.4.2 共有峰的标定 根据 8 批地钱药材指纹图谱的检测结果,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.1)数据匹配功能,在标定的共有色谱峰中选择了 6 个吸收峰强,特征明显,稳定性好的色谱峰作为地钱指纹图谱的共有峰,如图 2 所

示。在样品图谱中选择出峰时间适中、峰面积相对较大、峰型较稳定的 1 号色谱峰作为参照峰。

1.2.4.3 相似度评价 8 批地钱药材的指纹图谱采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012.1 版软件进行相似度评价,与生成的共有模式对照指

纹图谱 R(图 1) 进行比较, 其相似度为 0.943 ~ 0.774, 其相似度结果见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取条件考察结果分析

采用单因素变量法, 优选不同提取条件制备供试品溶液, 考察了不同提取因素对地钱药材中有效成分提取率的影响。提取方法考察了超声提取、冷浸提取、加热回流提取 3 种, 结果显示超声提取得到峰信息多, 共有峰峰面积大, 相比冷浸和回流更简便省时; 提取溶剂考察了甲醇、乙醇、水 3 种溶剂, 结果显示水提取只在前 30 min 出现部分小峰, 数量极少, 峰面积极低, 乙醇提取的峰在 28 min 后出现, 峰数量较多, 峰面积较高, 分离度适中, 而甲醇提取的峰分布均匀, 峰面积均比水、乙醇提取的高, 峰数量最多, 各峰分离好; 提取时间考察了 30、60、90 min 3 个时间, 结果显示 3 种时间提取的峰数量相当, 峰面积相差不大, 共有峰基本相似, 但从实验的严谨性、操作的简易性、时间成本节约及提高效率等综合分析考虑, 60 min 为提取时间的最佳选择。最后得到的供试品提取方法: 称取药材 1.0 g, 加入 25 mL 甲醇, 超声提取 60 min, 过滤, 离心, 即得。

### 2.2 色谱条件考察结果分析

在色谱条件的考察中, 分别考察了安捷伦 ZORBAX SB-C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、安捷伦 ZORBAX SB-Aq(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 DIKMA Diamonsil C18(2)(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 结果显示三种色谱柱的峰数量相当, 峰面积也相差不大, 但安捷伦 ZORBAX SB-Aq 的色谱图中, 基线不平稳, 出现漂移, 峰分离效果较差, DIKMA Diamonsil C18(2) 的色谱图中, 峰分离度一般, 峰面积是三种色谱中最低, 而安捷伦 ZORBAX SB-C18 的基线相对较平稳, 指纹信息相对较丰富, 色谱峰分离度较高且峰面积较大。流动相分别考察了乙腈-0.1%磷酸水溶液(图 3)、乙腈-水(图 4) 2 个流动相系统, 结果显示二者峰数量区别较小, 但乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相基线较平稳, 整体色谱峰分离度较高且峰面积较大; 采用全

波长扫描, 考察了 210、230、250、270、290 nm 检测波长, 结果显示 230 nm 下的色谱峰基线最平稳、主要峰的数目多、色谱峰分离度最好且峰面积最大。最终确定的色谱条件: 安捷伦 ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(B)-0.1%磷酸水溶液(D), 梯度洗脱, 5% → 5%B(0~5 min), 5% → 100%B(5~60 min), 100% → 100%B(60~80 min); 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长 230 nm; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL。

### 2.3 指纹图谱建立结果分析

8 批广西产拳卷地钱 HPLC 指纹图谱, 对精密度、稳定性、重复性进行考察, 计算相对保留时间 *RSD* 值及相对峰面积 *RSD* 值, 稳定性及重复性相对峰面积 *RSD* 值 > 3%, 其他 *RSD* 值均 < 3%; 8 产地指纹图谱采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.1) 分析匹配, 相似度为 0.943 ~ 0.774, 标定了 6 个共有峰, 并建立拳卷地钱的参照指纹图谱。

## 3 讨论与结论

中药是一个成分复杂的体系, 其功效往往是多种成分作用的体现, 而指纹图谱技术能基本反映中药内在质量的整体变化情况, 符合中药质量控制中的整体、宏观分析特点, 能较全面地控制中药质量的稳定性和有效性, 是全面控制中药质量的可行模式, 是反映中药整体质量的控制方法和手段(石上梅等, 2015)。本研究摸索得出的实验条件, 大多色谱峰的分离度良好, 能较好地与其他峰分离, 结果能较全面体现该药材整体的化学特征, 反映其内在的质量, 对地钱指纹图谱的研究具有一定参考。

本研究中, 不同批次药材共有峰的保留时间差别较小, 而共有峰的峰面积则存在较大的差异, 表明各产地中各成分的含量是不同的, 其中产地为钦州浦北的含量均较高, 产地为南宁武鸣的含量均较低; 8 批药材相似度范围为 0.943 ~ 0.774, 相似度差异较大, 表明不同产地的地钱其所含成分及质量分数虽然相对稳定, 但还是存在一定差异。钦州浦北的相似度为 0.774, 而整体含量较高,



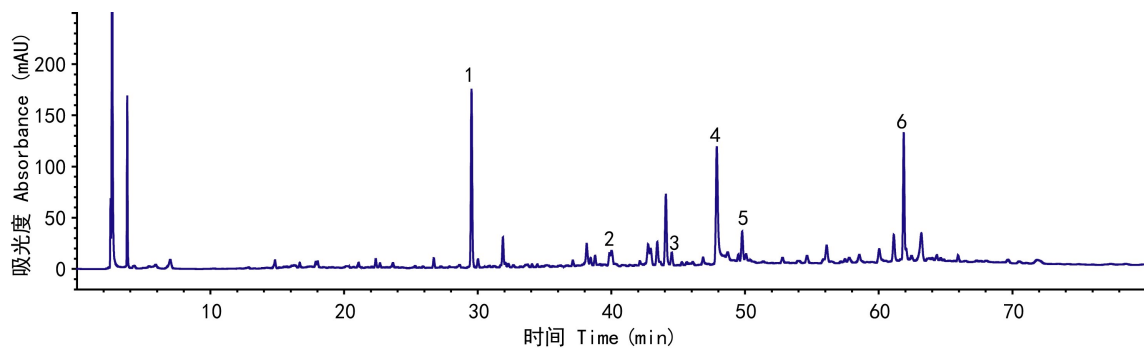


图 2 8 批拳卷地钱共有峰标定

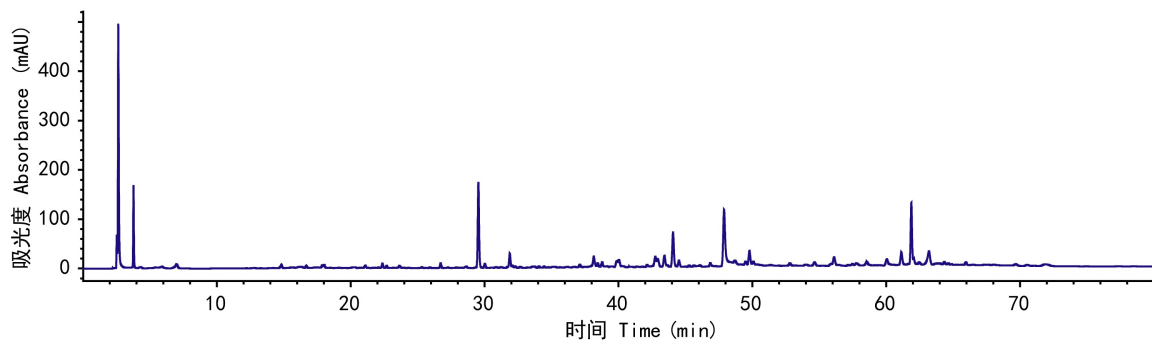
Fig. 2 Commonpeak calibration for eight batches of *Marchantia convoluta*

图 3 乙腈-0.1%磷酸水溶液指纹色谱图

Fig. 3 Fingerprint chromatogram of acetonitrile -0.1% phosphoric acid aqueous solution

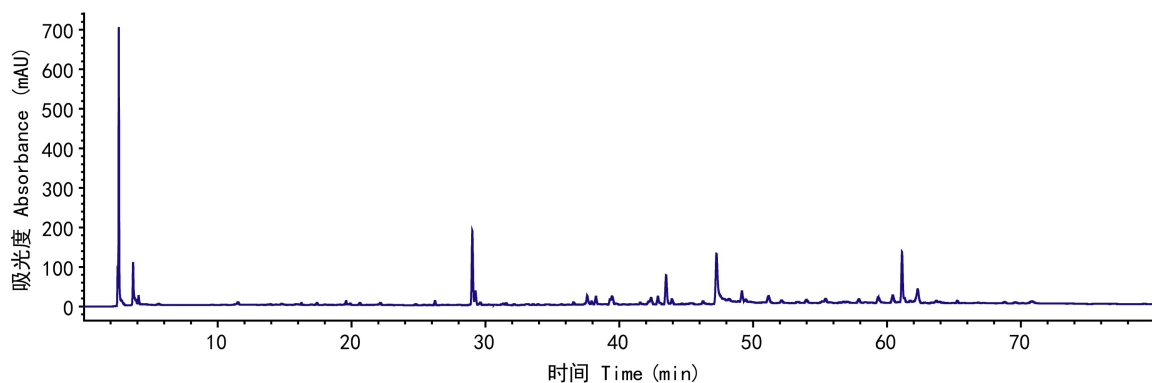


图 4 乙腈-水溶液指纹色谱图

Fig. 4 HPLC fingerprint of acetonitrile aqueous solution

其含量的高低是否影响相似度或不同的地理位置,如日照、水质、土质等导致的成分差异,这些影响因素仍需进一步考究。

该研究方法快捷、简便、高效,建立的 HPLC 指纹图谱可用于广西产拳卷地钱药材的定性鉴别,通过指纹图谱对地钱药材进行综合宏观分析,

有利于药材资源的开发利用及质量评价,可为广西产拳卷地钱药材质量的全面控制与进一步的开发利用提供科学依据。

## 参考文献:

CAO H, XIAO JB, ZHOU CS, et al, 2005a. Comparison of gas chromatography-mass spectrometry analysis in different extract parts of *Marchantia convoluta* Gao et Chang and study on partial biologic activity [J]. J Chin Mass Spectr Soc, 26(1): 1-5. [曹慧, 肖建波, 周春山, 等, 2005a. 拳卷地钱不同提取部位的气相色谱-质谱分析比较和部分生物活性研究 [J]. 质谱学报, 26(1): 1-5.]

CAO H, JIANG XY, XIAO JB, 2005b. Component analysis of volatile oil from *Marchantia convoluta* Gao et Chang [J]. Guihaia, 25(6): 596-597. [曹慧, 蒋新宇, 肖建波, 2005b. 拳卷地钱挥发油成分分析 [J]. 广西植物, 25(6): 596-597.]

CHEN J, 2008. Research progress of HPLC fingerprint of Chinese herbal medicine [J]. J Xinjiang Trad Chin Med, 26(3): 85-87. [陈菊, 2008. 中药 HPLC 指纹图谱的研究进展 [J]. 新疆中医药, 26(3): 85-87.]

LIU YX, GU DX, LU FL, et al, 2014. Establishment of high performance liquid chromatographic fingerprint of *Callicarpa nudiflora* different harvesting time. [J]. Guihaia, 34(2): 174. [刘幼娴, 谷陟欣, 卢凤来, 等, 2014. 不同采收期裸花紫珠的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 广西植物, 34(2): 174.]

SHI SM, YU JY, WANG X, et al, 2015. Explanation on Chinese Pharmacopoeia 2015 edition: Vol. I [J]. Chin Drugs Stand, 16(6): 403-405. [石上梅, 于江泳, 王旭, 等, 2015. 解读《中国药典》2015 年版: 第一部 [J]. 中国药品标准, 16(6): 403-405.]

TONG X, CHEN XQ, JIANG XY, et al, 2008. Study on the extraction of total flavonoids from *Marchantia convoluta* Gao et Chang by microwave and phytosol solvent [J]. Chin Trad Pat Med, 30(4): 625-627. [童星, 陈晓青, 蒋新宇, 等, 2008. 微波法和法多索法提取拳卷地钱中总黄酮的研究 [J]. 中成药, 30(4): 625-627.]

WANG YF, ZHANG KF, ZHOU YQ, et al, 2017. Protective effect and related mechanism of total flavonoids in *Marchantia convoluta* Gao et Chang on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride in rats [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 28(2): 277-279. [王跃峰, 张可锋, 周雨晴, 等, 2017. 拳卷地钱总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用及其作用机制 [J]. 时珍国医国药, 28(2): 277-279.]

WANG Q, XIAO XQ, DONG W, et al, 2017. Spectrum-effect relationship on expectorant efficacy of *Siraitia grosvenorii* [J]. Guihaia, 37(5): 606-609. [王勤, 肖喜泉, 董威, 等, 2017. 罗汉果祛痰作用谱效关系研究 [J]. 广西植物, 37(5): 606-609.]

XIAO JB, ZHOU CS, CAO H, 2005a. Supercritical fluid ex-

traction of CO<sub>2</sub> in volatile oil from *Marchantia convoluta* Gao et Chang and GC-MS analysis [J]. Trad Chin Drug Res Clin Pharm, 16(3): 191-194. [肖建波, 周春山, 曹慧, 2005a. 拳卷地钱挥发油的 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取及 GC-MS 分析 [J]. 中药新药与临床药理, 16(3): 191-194.]

XIAO JB, CAO H, XIANG HY, et al, 2005b. Determination of the content of flavonoids compounds in *Marchantia convoluta* Gao et Chang [J]. Nat Prodt Res Dev, 17(2): 186-189+194. [肖建波, 曹慧, 向海艳, 等, 2005b. 拳卷地钱中黄酮类化合物的含量测定 [J]. 天然产物研究与开发, 17(2): 186-189+194.]

XIAO JB, 2005. Study on separation, purification, structural characterizations and biological activity of liposoluble components in *Marchantia convoluta* Gao et Chang [D]. Changsha: Central South University. [肖建波, 2005. 拳卷地钱中脂溶性成分的分离纯化、结构表征及生物活性研究 [D]. 长沙: 中南大学.]

XU YQ, YANG H, LUO YH, 2016. Research progress of HPLC fingerprint in the process of Chinese Pharmacy [J]. J Str Pharm, 28(2): 8-11. [徐益清, 杨辉, 罗友华, 2016. 高效液相色谱指纹图谱在中药制药过程中的研究进展 [J]. 海峡药学, 28(2): 8-11.]

ZHU H, DU PL, ZHOU YQ, et al, 2013. SEM observation on thallus of three kinds of *Marchantia polymorpha* in Guangxi [J]. J Guangxi Trad Chin Med, 36(5): 77-78. [朱华, 杜沛霖, 周雨晴, 等, 2013. 广西产 3 种地钱叶状体的扫描电镜观察 [J]. 广西中医药, 36(5): 77-78.]

ZOU DF, ZHU H, XIAO JB, et al, 2005. Identification of *Marchantia polymorpha*, *Marchantia convoluta* Gao et Chang and *Marchantia paleacea* through UASLG [J]. Nat Prod Res Dev, 17(4): 463-464. [邹登峰, 朱华, 肖建波, 等, 2005. 地钱、拳卷地钱和粗裂地钱的紫外谱线组法鉴别 [J]. 天然产物研究与开发, 17(4): 463-464.]

ZHU H, ZOU DF, XIAO JB, et al, 2005a. Extraction and purification of total flavones from *Marchantia convoluta* Gao et Chang [J]. Food Sci, 26(10): 156-159. [朱华, 邹登峰, 肖建波, 等, 2005. 拳卷地钱总黄酮的提取与纯化 [J]. 食品科学, 26(10): 156-159.]

ZHU H, ZOU DF, HUANG HB, et al, 2005b. Determination of apigenin in *Marchantia convoluta* Gao et Chang [J]. Technol Dev Chem Ind, 34(2): 30-32+43. [朱华, 邹登峰, 黄海滨, 等, 2005b. 拳卷地钱中芹菜素的测定 [J]. 化工技术与开发, 34(2): 30-32+43.]

ZHU H, ZHOU CS, HUANG HB, et al, 2003. Study on the chemical components of lipophilic constituents in the *Marchantia convoluta* Gao et Chang [J]. Guihaia, 23(6): 571-572. [朱华, 周春山, 黄海滨, 等, 2003. 拳卷地钱脂溶性部分化学成分研究 [J]. 广西植物, 23(6): 571-572.]

ZHOU YQ, DU PL, WANG YF, et al, 2014. Genomic DNA extraction and ISSR-PCR amplification system optimization for *Marchantia convoluta* Gao et Chang [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 25(6): 1498-1500. [周雨晴, 杜沛霖, 王跃峰, 等, 2014. 拳卷地钱基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增体系优化 [J]. 时珍国医国药, 25(6): 1498-1500.]