

- 3-*O*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(10): 1284-1286.
- [26] 唐晓琴, 张丽艳, 黄 颖, 等. 苗药追风伞药材质量标准提升研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(7): 36-40; 221.
- [27] 何烟林, 邵凤英, 穆开朗, 等. 苗药追风伞质量标准提升研究[J]. 广州化工, 2023, 51(1): 77-79; 141.
- [28] 曹小霞, 边子妍, 丁金国, 等. 基于网络药理学和分子对接
- 探讨瓜蒌皮注射液治疗冠心病的作用机制[J]. 天津中医药大学学报, 2024, 43(3): 193-200.
- [29] 罗 欢, 熊凡捷, 沈 涛. 茱萸圆方治疗动脉粥样硬化和高脂血症的网络药理机制探析[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(2): 292-297.
- [30] 蔡可珍, 郑 琴, 朱徐东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学与实验验证探讨四君子汤治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1620-1631.

大补阴丸中醋龟甲的真伪鉴定研究

陈 香¹, 韩 婧², 王佳祺³, 彭江松², 曹邵阳², 宁艺柯², 夏国华^{2*}, 杨 欢^{2*}
(1. 镇江市食品药品监督检验中心, 江苏 镇江 212050; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 3. 南京中医药大学附属镇江医院药剂科, 江苏 镇江 212003)

摘要: **目的** 建立大补阴丸中醋龟甲的真伪鉴定方法。**方法** 根据龟甲(乌龟)及其伪品(花龟、巴西龟和鳄龟)的线粒体基因序列差异设计了引物 WG、HG、BX 和 EG, 采用荧光定量 PCR 扩增 DNA 并进行方法学考察, 对 8 批大补阴丸中醋龟甲进行鉴定。**结果** 含有乌龟、花龟、巴西龟和鳄龟的 DNA 供试品在与上述引物经扩增后, 分别检测到了荧光信号, 并具备特定温度单一峰, T_m 分别为 75.40、79.12、80.16、78.82 °C; 最低检出限为 1×10^2 copies/ μ L, 重复性实验中 CV<1%; 分别有 2 批、1 批和 5 批大补阴丸中所含醋龟甲被鉴定为正品、掺伪品和伪品。**结论** 该方法可用于含醋龟甲制剂的质量控制; 大补阴丸中醋龟甲伪品较多, 其质量管理亟待加强。

关键词: 大补阴丸; 中成药; 醋龟甲; 特异性引物; 荧光定量 PCR

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)03-1031-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.03.051

龟甲为乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的背甲及腹甲, 归肝、肾、心经^[1]; 其炮制品醋龟甲临床应用较为广泛, 主要用于改善骨质疏松^[2]、贫血^[3]、免疫力低下^[4]等。然而, 由于龟科物种多样和各地使用习惯不同等, 市场上常见一些伪品, 如花龟 *Mauremys sinensis*、巴西龟 *Trachemys scripta* 和鳄龟 *Chelydra serpentina*^[5], 对龟甲及含龟甲制剂的安全与有效造成了不良影响。2020 年版《中国药典》一部所载“成方制剂”的“鉴别”和“检查”项下偶见醋龟甲的显微鉴别, 但其特征性较弱, 且其成分较复杂, 难以准确鉴定醋龟甲炮制品的真伪。

荧光定量 PCR 技术利用能与双链 DNA 非特异性结合的荧光染料或与目的片段特异性结合的荧光探针, 通过在扩增过程中采集荧光信号, 定性与定量分析未知 DNA 模板; 该技术灵敏度高、特异性强^[6-12], 近年来已应用于石斛、蜈蚣、藿香、人参、苍术、姜黄等中药的鉴别^[13-18]。

本研究根据龟甲及其伪品(花龟、巴西龟和鳄龟)的线粒体基因序列差异设计了物种特异性引物, 并通过荧光定量 PCR 建立了一种鉴定大补阴丸中醋龟甲成分真伪的检测方法, 可作为评价与监控该中成药质量的常规手段, 有助于保障其临床用药的安全性和有效性以及维护良好的市场秩序。

1 材料

1.1 仪器 Thermomixer Comfort 恒温混匀仪、MiniSpin 离心机(德国艾本德公司); AL104 电子分析天平(万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); HS-840U 净化工作台(苏州净化设备有限公司); NanoDrop 1000 核酸蛋白分析仪、ABI StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 药物 乌龟、花龟、巴西龟和鳄龟分别于 2016 年至 2021 年购自全国各地水产市场, 并经 COI 条形码鉴定其基

收稿日期: 2024-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(82173937); 镇江市科技计划项目(SH2024055)

作者简介: 陈 香(1981—), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药分析与质量控制。Tel: 13852909968, E-mail: chenxiang0917@163.com

***通信作者:** 夏国华(1977—), 男, 博士, 高级实验师, 研究方向为药学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: xgh-78131@yeah.net
杨 欢(1980—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: yanghuan1980@ujs.edu.cn

原分别为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii*、花龟 *Mauremys sinensis*、巴西龟 *Trachemys scripta* 和鳄龟 *Chelydra serpentina*。盐知母（批号 220201）、盐黄柏（批号 201001）和熟地黄（批号 210601）购自镇江市中医院，经江苏大学药学院陈钧教授鉴定，并采用 ITS 条形码进一步明确其基原分别为知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge.、黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid.、地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.。猪脊髓购自湖南省岳阳市源泉汇万家店，采用 COI 条形码鉴定其基原为家猪 *Sus scrofa*。 *Escherichia coli* Top10 感受态细胞购自生工生物工程（上海）股份有限公司；pGEX-4T-1 载体由北京全式金生物技术有限公司提供。8 批大补阴丸分别购自厂家 A（编号 DB1~DB3，DB5~DB7，批号 211102、201204、210706、220501、220608、220801）和 B（编号 DB4、DB8，批号 1900329、2200350）。

1.3 试剂 DNA 提取酚试剂（北京索莱宝科技有限公司）；BeyoFast SYBR Green qPCR Mix（2×，High ROX）、低电渗琼脂糖（上海碧云天生物技术股份有限公司）；Ethidium Bromide、PVP-40、Tris-base [生工生物工程（上海）股份有限公司]；Proteinase K [西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司]；Low DNA Ladder（货号 SN127，南京生兴生物技术有限公司）；提取液 50 mL 依照文献 [19] 方法配制；特异性引物 pGEX、WC、HC、BC 和 EC 由生工

生物工程（上海）股份有限公司合成。

2 方法

2.1 DNA 模板溶液制备 参照 2020 年版《中国药典》一部所载“大补阴丸”制法^[1]，平行制备 10 批大补阴丸（编号 DG1~DG10）。此外，将醋龟甲更换为醋花龟甲、醋巴西龟甲或醋鳄龟甲，制成大补阴丸伪品各 4 批（编号分别为 DH1~DH4、DX1~DX4、DE1~DX4）；不加入醋龟甲制成 4 批阴性制剂（编号 DN1~DN4）。取大补阴丸供试品粉末 150.0 mg，加入 995 μL 提取液和 5 μL β-巯基乙醇，按照文献 [19] 方法制得 DNA 模板溶液，测定 DNA 浓度及 A₂₆₀/A₂₈₀，-20 ℃ 保存备用。

2.2 特异性引物设计 从 GenBank 数据库中搜索下载乌龟、花龟、巴西龟及鳄龟的线粒体全基因序列（登录号 NC_006082.1、NC_011573.1、NC_016685.1、NC_011198.1），采用 SSRHunter 软件（version 1.3）寻找上述龟甲及其伪品基原所含有 SSR 片段的基因序列（约 300 bp）；采用 Oligo 7.0 软件设计引物、DNAMAN 6.0 软件及 NCBI 平台（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>）在线分析其特异性，将引物与上述 4 个物种的线粒体 DNA 序列进行匹配和比对，从中选择与相应物种序列碱基匹配并且与其他物种不匹配的引物，所得 4 对引物的序列、产物长度见表 1。

表 1 特异性引物信息

基原	引物	引物序列(5'→3')		产物长度/bp
<i>Chinemys reevesii</i>	WG	正向	ACAGCCCAATCTATAAACACATTCC	81
		反向	GTTTAGTCCTCCCCATCCTCC	
<i>Mauremys sinensis</i>	HG	正向	ACCAACCGCGTTAGCTC	62
		反向	AAGATTTGAACCATGTAGGCTT	
<i>Trachemys scripta</i>	BX	正向	CACCATCCGCCGTAGCTTC	99
		反向	TTTATGTGGTGGGGTTTGTGTT	
<i>Chelydra serpentina</i>	EG	正向	ATTAGCCCGAATGGTCACTTGC	74
		反向	ACTAGCGTTTATGTCAGTTTGGTCA	

2.3 阳性对照构建 采用引物 pGEX、WC、HC、BC 和 EC 分别扩增 pGEX-4T-1 质粒及 *C. reevesii*、*M. sinensis*、*T. scripta* 和 *C. serpentina* 的扩增子（表 2）。将目的片段与 pGEX-4T-1 载体于 50 ℃ 连接 15 min，所得产物分别命名为

P-WG、P-HG、P-BG 和 P-EG；按照文献 [19] 方法转化、接种平板、培养、筛选；质粒小提、测定 DNA 浓度；*E. coli* 菌液测序，确认重组质粒的准确性。

表 2 用于构建阳性对照的引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')		
pGEX	正向	CGCATCGTGACTGACTGACGATCT	
	反向	CGGGGATCCACGCGGAACC	
WC	正向	GGTTCCGCGTGGATCCCCGGACAGCCCAATCTATAAACACATTCC	
	反向	TCGTCACTCAGTCACGATGCGTTTAGTCCTCCCCATCCTCC	
BC	正向	GGTTCCGCGTGGATCCCCGGCACCATCCGCCGTAGCTTC	
	反向	TCGTCACTCAGTCACGATGCTTTATGTGGTGGGGTTTGTGTT	
HC	正向	GGTTCCGCGTGGATCCCCGGACCAACCGCGTTAGCTC	
	反向	CAGATCGTCAGTCAGTCACGATGCAAGATTTGAACCATGTAGGCTT	
EC	正向	GGTTCCGCGTGGATCCCCGGATTAGCCCCGAATGGTCACTTGC	
	反向	TCGTCACTCAGTCACGATGCACTAGCGTTTATGTCAGTTTGGTCA	

2.4 荧光定量 PCR 扩增 反应体系（20 μL）：模板 DNA 2 μL，引物各 2 μL，SYBR Green Qpcr Mix 10 μL，无菌超

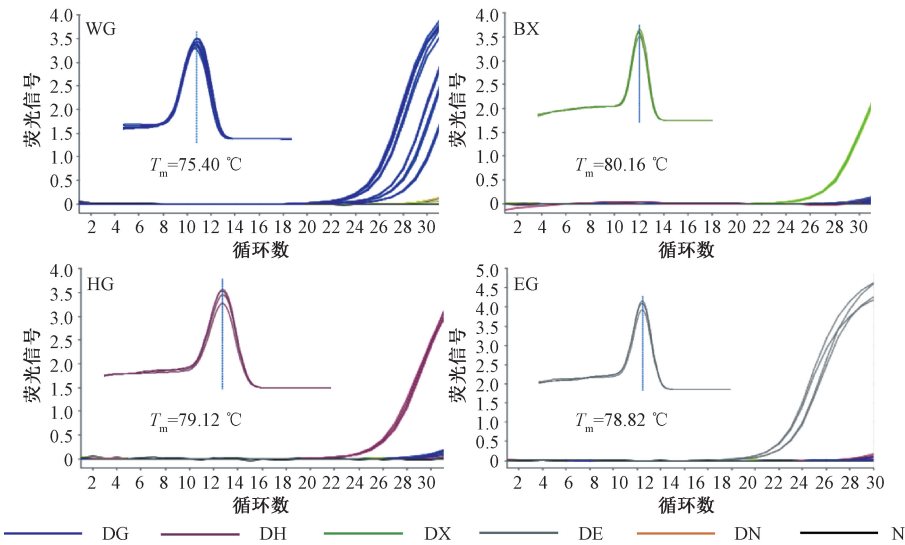
纯水 6 μL。扩增程序：95 ℃ 预变性 2 min；95 ℃ 变性 15 s，63 ℃ 退火延伸 15 s，33 个循环。

2.5 线性关系考察 以“2.3”项下构建的重组质粒 P-WG 为标准,十倍稀释至 $1\times 10^6\sim 10\text{ copies}/\mu\text{L}$,进行荧光定量 PCR ($n=3$)。以 C_t 值为纵坐标 (Y),重组质粒拷贝数对数值为横坐标 (X) 进行回归,绘制标准曲线。

2.6 特异性、灵敏度及重复性试验 按“2.1”项下方法制备大补阴丸及其伪品制剂与阴性制剂的 DNA 模板溶液 ($10\text{ ng}/\mu\text{L}$),进行荧光定量 PCR 扩增验证特异性;将 DNA 扩增产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,以验证特异性扩增的准确性;将提取的重组质粒 P-WG、P-HG、P-BG 和 P-EG 分别溶解于 TE 缓冲液中,并十倍稀释至 $1\times 10^6\sim 10\text{ copies}/\mu\text{L}$,进行荧光定量 PCR 以考察该方法的灵敏度;此外,对 2 个物种的 DNA 模板进行扩增,对同一份 DNA 模板溶液平行测定 3 次,考察组内重复性;对同一批次样品独立检测 3 次,考察组间重复性,计算 C_t 值、标准差 (SD) 和变异系数 (CV)。

表 3 扩增产物序列及其 Genbank 同源率

基原	名称	扩增产物序列(5'→3')	序列编号	同源率
Chinemys reevesii	WG-F	ACATTCTAATAGTAATACTAGGACTAGTATCGATTATAATTGTAGGCTGGAGAG	AY676201.1	94.44%
	WG-R	AAGGGGATGCCTAAGTCCTTAGTATTACTATTAGGAATGCTTTATAGATTGGGCTGT		
Mauremys sinensis	HG-F	CACAGCTTCTGAATCGCCCTTCTCGGCATACACCAGATCA	FJ392294.1	95.31%
	HG-R	TGATCTGCTGTATGCCGAGAAGGGCGATTGAGAAGCTGTG		
Trachemys scripta	BX-F	TAACCCGGTTTCAAAAAAGACCTATAATCACAAGACCTGAAACAAGCAACACAAACC	KM216749.1	98.28%
	BX-R	ACGGGGTTACGGTTTTGTGATAATAGTTCITTTTTGTACGGTGTGGAAGGGTTTGA		
Chelydra serpentina	EG-F	TCCCATAAATTCCCGAGGAATGACCCAAGTACATAAACGCTAGTATC	EF122793.1	97.56%
	EG-R	TAAAAAAGGTTTAGGTTTGACGAGAGCAGTGACCATTTCGGGCTAAT		



注: WG、HG、BX、EG 分别为乌龟、花龟、巴西龟、鳄龟的特异性引物; DG 为自制大补阴丸, DH、DX、DE 分别为中华花龟、巴西龟、鳄龟伪品制剂, DN 为阴性制剂, N 为空白对照。

图 1 特异性试验的扩增曲线和溶解曲线

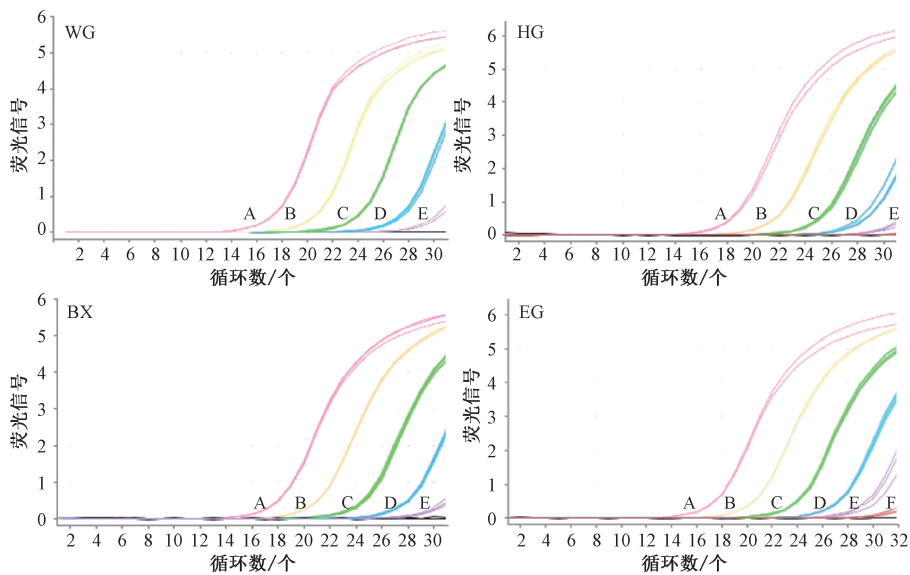
3.2 灵敏度试验 由图 2 可知,当供试品 DNA $\geq 1\times 10^2\text{ copies}/\mu\text{L}$ 时,经特异性引物 WG、HG 或 BX 扩增后均观察到荧光信号,可见这 3 对引物的最低检出限均达到了 $1\times 10^2\text{ copies}/\mu\text{L}$;此外,当供试品 DNA $\geq 10\text{ copies}/\mu\text{L}$ 时,经特

2.7 市售大补阴丸中醋龟甲检测及其真伪鉴定 8 批市售大补阴丸按照“2.1”项下方法制备 DNA 模板溶液,在“2.4”项条件下进行荧光定量 PCR 扩增,检测龟甲及其伪品基原 DNA。

3 结果

3.1 特异性试验 在 NCBI 平台载入引物 WG、HG、BX 和 EG 的扩增产物序列并进行比对分析,其同源率见表 3。由图 1 可知,引物 WG、HG、BX 和 EG 分别仅与 *C. reevesii*、*M. sinensis*、*T. scripta* 和 *C. serpentina* 的 DNA 模板进行扩增产生了荧光信号;溶解曲线为单一峰,表明未形成引物二聚体。此外, DNA 扩增子的 T_m 值与理论参数基本相符,分别为 75.40、79.12、80.16、78.82 $^{\circ}\text{C}$,表明该方法特异性良好,能够鉴别大补阴丸中的醋龟甲成分,且不易受样品性状、辅料等的影响。

异性引物 EG 扩增后也观察到了荧光信号,因此该引物的最低检出限为 $10\text{ copies}/\mu\text{L}$,表明该方法灵敏度较高,可分析中成药中醋龟甲炮制品的微量 DNA。



注：WG、HG、BX、EG 分别为乌龟、花龟、巴西龟、鳄龟的特异性引物；A~F 分别为 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、10 copies/ μL 。

图 2 荧光定量 PCR 灵敏度试验 ($n=3$)

3.3 重复性试验 由表 4 可知，组内重复性试验中引物 WG、HG、BX 和 EG 的 CV 分别为 0.31%、0.03%、0.16%、0.72%；此外，组间重复性试验中 4 对引物的 CV

则分别为 0.35%、0.03%、0.21%、0.27%，以上数值均小于 1%，表明该方法具有良好的重复性。

表 4 荧光定量 PCR 重复性检测 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

引物	组内重复性		组间重复性	
	Ct	CV	Ct	CV
WG	29.44±0.090	0.31%	29.52±0.104	0.35%
HG	28.99±0.008	0.03%	29.00±0.010	0.03%
BX	29.01±0.045	0.16%	29.07±0.060	0.21%
EG	31.66±0.227	0.72%	31.60±0.085	0.27%

3.4 线性关系考察 得回归方程为 $Y=-3.530X+37.15$ ($r^2=0.9959$)，重组质粒标准品的拷贝数对数值与 Ct 值在 $10\sim1\times10^6$ copies/ μL 范围内线性关系良好。

3.5 样品检测 由表 5 可知，8 批市售大补阴丸中有 2 批（编号 DB1、DB2）通过引物 WG 扩增后产生了荧光信号，与其余 3 对伪品引物扩增后均未产生荧光信号，表明其中含有乌龟 DNA 且不含其他 3 个伪品 DNA，因此被鉴定为正品；DB3 经引物 WG 和 HG 扩增后均产生了荧光信号，表

明该批大补阴丸中不仅含有乌龟 DNA 还含有花龟 DNA，因此被鉴定为掺伪品；DB4 和 DB5 经 4 对特异性引物扩增后，仅与引物 BX 产生了荧光信号，表明其中含有伪品巴西龟 DNA 且不含其他 3 个物种 DNA；DB6~DB8 经 4 对引物扩增后，仅与引物 EG 扩增产生了荧光信号，表明表明其中含有鳄龟 DNA 且不含其他 3 个物种 DNA。综上所述，8 批市售大补阴丸中醋龟甲炮制品经鉴定 25% 为正品，12.5% 为掺伪品，62.5% 为伪品，亟待相关部门加强监管。

表 5 市售大补阴丸中醋龟甲炮制品的鉴定结果 ($\bar{x}\pm s$)

编号	Ct				拷贝数/(copies· μL^{-1})	鉴定结果
	WG	HG	BX	EG		
DB1	30.05±0.230	—	—	—	$10^{2.01}$	正品
DB2	29.60±0.160	—	—	—	$10^{2.14}$	正品
DB3	29.98±0.190	29.74±0.049	—	—	$10^{2.03}$	掺伪品
DB4	—	—	29.84±0.223	—	—	伪品
DB5	—	—	29.95±0.217	—	—	伪品
DB6	—	—	—	30.79±0.255	—	伪品
DB7	—	—	—	31.82±0.092	—	伪品
DB8	—	—	—	30.09±0.226	—	伪品

注：WG、HG、BX、EG 分别为乌龟、花龟、巴西龟、鳄龟的特异性引物。

4 讨论

中成药以中药饮片和提取物等为原材料，成分较为复杂，生产工艺及剂型多种多样，且常常含有辅料，其中动物药成分经过进一步加工后原有特征极大减弱，导致传统的性状鉴定、显微鉴定难以发挥作用。近年来，分子生物学技术作为高效准确识别物种来源的方法被广泛应用。与其他大分子（RNA、蛋白质及多肽）相比，DNA 更具稳定性，且普遍存在于动物组织中，从非常少量的样品中也能被提取出来，因此是识别动物深加工产品中动物基原的理想而有力的物质^[20]。

经荧光定量 PCR 方法检测，8 批市售大补阴丸中醋龟甲有 2 批被鉴定为正品，1 批为掺伪品，其余 5 批为伪品，表明大补阴丸中醋龟甲伪品较多，其临床用药的安全性与有效性堪忧，质量监管亟待加强。本实验方法可作为醋龟甲及含醋龟甲中成药质量评价的常规技术，为其真伪检识提供了可靠的检测手段；同时，基于荧光定量 PCR 的分子鉴定方法具有灵敏度高、特异性强等特点，有望在动物药及含动物药中成药的市场流通监控与原材料追溯等方面发挥重要作用。

本实验仅针对处方制剂所含单一动物药进行鉴定研究，而中成药中含有多种成分，包括动物药和植物药等，其真伪鉴定更具挑战性。本研究中所建立的鉴定技术局限于检测醋龟甲及其常见伪品，但是难以准确区分中成药中龟甲药材与饮片；此外，难以通过市售炮制品及中成药中测得的模板 DNA 量判断掺伪比例。在后续工作中，拟通过多种技术联合对龟甲药材、生品和醋制品进行成分分析并寻找特征识别物，从而完善与提升龟甲及其炮制品和中成药的专属性鉴定方法。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020.

[2] 李晶峰，李春楠，杨小倩，等. 基于网络药理学对龟甲抗骨质疏松的作用机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志，2020，26（12）：1760-1767.

[3] 胡海林，肖 丹，王 磊，等. 龟甲胶对环磷酰胺引起的贫血大鼠的改善作用研究[J]. 中医药信息，2021，38（10）：49-52.

[4] 肖 丹，唐 宇，何清湖，等. 龟甲胶对不同年龄不同性别免疫低下型大鼠的调节作用研究[J]. 时珍国医国药，2022，33(6)：1322-1325.

[5] 张雪艳，袁 媛，胡启跳，等. 龟甲的特异性 PCR 及高分辨率熔解曲线技术鉴别方法研究[J]. 中国现代中药，2019，21(9)：1215-1220.

[6] Hakan F, Pelin S, Kubra Y, *et al.* Robust molecular detection of the new tomato brown rugose fruit virus in infected tomato and

pepper plants from Turkey[J]. *J Integr Agric*, 2021，20(8)：2170-2179.

[7] Li J P, Wei Y X, Li J C, *et al.* A novel duplex SYBR green real-time PCR with melting curve analysis method for beef adulteration detection[J]. *Food Chem*, 2021，338：127932.

[8] Shi R Z, Huang M H, Wang J, *et al.* Molecular identification of dried squid products sold in China using DNA barcoding and SYBR green real time PCR[J]. *Food Addit Contam A*, 2020，37(7)：1061-1074.

[9] Shunsuke F, Yoshihisa H, Hidenori N. On-site identification of meat species in processed foods by a rapid real-time polymerase chain reaction system[J]. *Meat Sci*, 2017，131：56-59.

[10] 周 林，孙 涛，滕少娜，等. 人参实时荧光定量 PCR 鉴定方法的建立[J]. 西南大学学报（自然科学版），2022，44（7）：70-75.

[11] 杨 健，李 靖，薛维娜，等. 实时荧光定量 PCR 法鉴别川贝母掺伪[J]. 中成药，2020，42(5)：1262-1268.

[12] 叶洁婷，李晓蕾，晁 志. 基于荧光定量 PCR 方法检测金龙胶囊配方中守宫投料量的初步研究[J]. 中国中药杂志，2018，43(23)：4582-4586.

[13] Yan W J, Zhang J Z, Zheng R, *et al.* Combination of SYBR green II and TaqMan probe in the adulteration detection of *Dendrobium devonianum* by fluorescent quantitative PCR[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2015，50(12)：2572-2578.

[14] Uh Y R, Jang C S. Establishing DNA markers to differentiate *Agastache rugosa* and *Pogostemon cablin*, which are confusedly used as medicinal herbs, using real-time PCR[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2022，32(2)：239-247.

[15] Wang H, Wang J, Li G, *et al.* A simple real-time polymerase chain reaction (PCR) -based assay for authentication of the Chinese *Panax ginseng* cultivar Damaya from a local *ginseng* population[J]. *Genet Mol Res*, 2016，15(2)：15028801.

[16] Oh S H, Kim Y D, Jang C S. Development and application of DNA markers to detect adulteration with *Scopolia japonica* in the medicinal herb *Atractylodes lancea*[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2021，31(1)：89-100.

[17] Oh S H, Jang C S. Development and validation of a real-time PCR based assay to detect adulteration with corn in commercial turmeric powder products[J]. *Foods*, 2020，9(7)：882.

[18] Suh S M, Kim E, Kim M J, *et al.* Development of real-time PCR method for rapid and accurate detection of centipedes (*Scolopendra mutilans*) in food[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2023，32(7)：979-985.

[19] 韩 婧，陈 香，李 叶，等. 荧光定量 PCR 法鉴别蛤蚧定喘丸中醋鳖甲[J]. 中成药，2024，46(4)：1209-1213.

[20] Mishra P, Shukla A K, Sundaresan V. Candidate DNA barcode tags combined with high resolution melting (Bar-HRM) curve analysis for authentication of *Senna alexandrina* Mill. with validation in crude drugs[J]. *Front Plant Sci*, 2018，9：283.