



研究论文 ORIGINAL PAPERS

基于氨基酸成分的象牙及其仿制品对比分析

刘阿静¹, 苏 倡², 解迎双¹, 张利峰³, 罗 丽¹, 王慧珺¹, 张红艳¹, 王 波^{1*}

(1. 兰州海关技术中心, 兰州 730010;

2. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨 150040;

3. 中国海关科学技术研究中心, 北京 100000)

稿件运行过程

收稿日期: 2025-06-11

修回日期: 2026-01-05



关键词: 象牙;

仿制品;

氨基酸;

化学模式识别;

物种鉴别

Keywords: Ivory;

Imitations;

Amino acid;

Chemical pattern recogni-

tion;

Species identification

中图分类号: Q95-33; O657.99

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2026)-03-0349-11

DOI: 10.12375/ysdwxb.202506005

摘 要

为建立一种基于氨基酸成分的象牙及其仿制品的快速鉴别方法,本研究对非洲象牙、猛犸象牙、鹿骨、牛骨和野猪牙共56份样本中18种氨基酸的组分及含量进行分析测定,并运用正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)、方差分析和系统聚类分析方法,研究不同基原样本间氨基酸成分差异特征。结果表明:不同基原样本的氨基酸组成存在明显差异。通过OPLS-DA模型筛选出异亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸和胱氨酸5种具有鉴别意义的差异氨基酸;5种差异氨基酸的总含量均值从高到低依次为鹿骨、猛犸象牙、野猪牙、牛骨和非洲象牙;系统聚类分析在欧几里得距离为5时,将56份基原样本分为5类,结果与OPLS-DA模型一致。研究表明,基于氨基酸组分并结合化学模式识别模型,能够实现对象牙及其仿制品的有效鉴别,为相关物种鉴定、海关监管与保护执法提供了新的技术支撑。

Comparative Analysis of Ivory and Imitations
Based on Amino Acid CompositionLIU Ajing¹, SU Chang², XIE Yingshuang¹, ZHANG Lifeng³,
LUO Li¹, WANG Huijun¹, ZHANG Hongyan¹, WANG Bo^{1*}

基金项目: 海关总署科研项目(2022HK008);科技基础资源调查专项项目(2023FY100400);兰州海关科研项目(LK-2024-002)

第一作者简介: 刘阿静(1988—),女,高级工程师;主要从事色谱分析研究。E-mail:253833374@qq.com

*通信作者: 王波, E-mail:210841563@qq.com

- (1. Lanzhou Customs Technology Center, Lanzhou 730010, China;
2. College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;
3. Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100000, China)

Abstract: To establish a rapid identification method for ivory and its imitations based on amino acid compositions, the components and contents of 18 amino acids in 56 samples of African ivory, mammoth ivory, deer bone, cow bone and wild boar tooth were analyzed by using orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), analysis of variance and hierarchical cluster analysis, and the differential characteristics of amino acid compositions among samples of different origins were investigated. The results demonstrated that there were significant differences in amino acid compositions among samples of different origins. Five differential amino acids, including isoleucine, phenylalanine, lysine, histidine and cystine were screened out by OPLS-DA model. The descending order of the mean total contents of the five differential amino acids was deer bone, mammoth ivory, wild boar tooth, cow bone and African ivory. When the Euclidean distance was five, the 56 samples were classified into five categories by hierarchical cluster analysis, and the clustering results were consistent with the OPLS-DA model. This study indicated that the combination of amino acid composition analysis and chemometric pattern recognition models would effectively identify ivory and its imitation products, which provided a new technical support for related species identification, customs supervision and conservation law enforcement.

象牙作为一种兼具经济价值、文化内涵与收藏意义的重要自然资源^[1],其国际贸易受到严格的法律限制。《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)原则上禁止商业性象牙国际贸易^[2],我国也于2018年起全面停止加工和销售象牙及其制品^[3]。尽管如此,非法盗猎、走私象牙及相关制品的活动仍时有发生,市场上部分仿制品也混杂流通,不仅严重威胁濒危物种生存、破坏生态平衡,也扰乱了正常的市场秩序,对野生动物保护工作造成负面影响。因此,建立准确、可靠的象牙及其仿制品鉴别技术具有极其重要的现实意义。目前,象牙鉴别的主要方法包括形态学与显微结构观察、光谱分析、分子生物学检测、化学成分分析和热分析等^[4-8]。这些方法虽然在一定程度上能区分象牙与人工合成材料或某些天然替代物,但仍存在一定局限性,如对样品完整性要求高、设备依赖性强和难以实现快速现场筛查等。因此,发展基于稳定化学特征的新型鉴别方法,成为该领域的重要研究方向。

象牙的化学组成主要包括无机相(碳羟基磷灰石)和有机相(胶原蛋白),其中胶原蛋白富含多种氨基酸,其组成模式具有物种特异性^[9-11]。系统分析象牙及其常见仿制品中的氨基酸组成与含量差异,不仅有助于揭示不同材质在微观化学结构上的区别,

也可为评估象牙在不同环境下的保存状态及开展针对性保护修复提供科学依据。然而,当前尚缺乏对象牙及其仿制品氨基酸模式的相关研究。基于此,本研究选取非洲象牙、猛犸象牙、鹿骨、牛骨和野猪牙5类基原样本,测定其氨基酸组成与含量,并运用化学模式识别法分析象牙与其仿制品之间的差异,旨在构建一种基于氨基酸组分的鉴别模型,为象牙及其仿制品的准确鉴别、非法贸易监管和濒危物种保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

象牙样本包括非洲象牙15份(J1~J15)和猛犸象牙16份(M60~M75)。仿制品样本包括野猪牙9份(Y1~Y9)、鹿骨4份(L1~L4)和牛骨12份(N1~N12),共计56份,均由东北林业大学国家林业和草原局野生动植物检测中心提供。所有样本经次氯酸钠溶液浸泡杀菌后,依次使用无菌水和乙醇浸泡冲洗以完成表面清洁,随后研磨备用^[12]。

35种氨基酸及相关含氮化合物的混合标准溶液(色谱纯,1 mmol/L)购自赛卡姆(北京)科学仪器有限公司,具体包括磷酸丝氨酸(Ser-p)、牛磺酸(Tau)、磷酸乙醇胺(PETH)、尿素(Urea)、天冬氨酸(Asp)、

苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酸(Glu)、 α -氨基己二酸(α -Aaa)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、瓜氨酸(Cit)、 α -氨基丁酸(α -Aba)、缬氨酸(Val)、胱氨酸(Cys₂)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、 β -丙氨酸(β -Ala)、 β -氨基异丁酸(β -Aiba)、 γ -氨基丁酸(γ -Aba)、组氨酸(His)、3-甲基组氨酸(3-MetHis)、1-甲基组氨酸(1-MetHis)、肌肽(carnosine)、色氨酸(Trp)、鸟氨酸(Orn)、赖氨酸(Lys)、氨(ammonia)、精氨酸(Arg)、羟脯氨酸(Hyp)和脯氨酸(Pro)。其余试剂均为分析纯,其中锂盐系统洗脱缓冲液(A、B、C)、茚三酮、抗坏血酸、苯酚和样品稀释液(pH = 2.20)购自赛卡姆(北京)科学仪器有限公司;次氯酸钠、盐酸(37%)、乙酸钾、乙酸钠、乙酸和无水乙醇购自天津市科密欧化学试剂有限公司。实验用水为屈臣氏蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 样品溶液制备

精密称取0.1 g样品置于水解管中,准确加入10 mL 6 mol/L盐酸溶液(含0.1%苯酚)。充入氮气后迅速拧紧螺丝盖,置于110 °C电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9123A,上海一恒科学仪器有限公司)内水解22 h。取出水解管,冷却至室温后,准确移取500 μ L水解液于玻璃干燥管中,50 °C真空浓缩至近干,用4 mL样品稀释液(pH = 2.20)溶解,过0.22 μ m滤膜,即得供试品溶液,待测。

1.2.2 茚三酮反应液配制

钾钠缓冲液制备:称取98.0 g乙酸钾和136.0 g三水乙酸钠于烧杯中,加入100.0 mL乙酸及适量蒸馏水,溶解,定容至500 mL容量瓶中,用乙酸调节pH至5.51,备用。

茚三酮反应液制备:称取20 g茚三酮和2 g苯酚于600 mL甲醇中溶解,转移至1 L储液瓶中,加入400 mL钾钠缓冲液,混匀,通氮气5 min,加入0.25 g抗坏血酸还原剂,摇匀,继续通氮气5 min,加盖密封4 h后备用。

1.2.3 色谱条件

采用LCA K07/Li磺酸基强阳离子交换色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 7 μ m);流动相为锂盐系统缓冲液,包括缓冲液A(氢氧化锂-柠檬酸-无水乙醇-盐酸-辛酸缓冲液,pH = 2.90)、缓冲液B(氯化锂-氢氧

化锂-柠檬酸-盐酸-辛酸缓冲液,pH = 4.20)、缓冲液C(硼酸-氯化锂-氢氧化锂-柠檬酸-盐酸-辛酸缓冲液,pH = 8.00)和水(D)。流速0.45 mL/min,进样量50 μ L,柱温57 °C。检测波长440 nm(用于Hyp和Pro)和570 nm(用于其余33种氨基酸及相关含氮化合物)。茚三酮反应液流速0.35 mL/min,反应器温度130 °C。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间 /min Time	流动相比比例 /% Mobile phase ratio			
	A	B	C	D
0	100	0	0	0
10.0	100	0	0	0
11.0	79	21	0	0
30.0	79	21	0	0
41.0	62	38	0	0
63.0	0	100	0	0
64.0	0	100	0	0
69.0	0	0	100	0
79.0	0	0	100	0
82.0	0	0	86	14
84.0	0	0	86	14
84.1	0	0	78	22
96.0	0	0	76	24
102.0	0	0	76	24
102.1	0	0	0	100
106.5	0	0	0	100
106.6	100	0	0	0
108.0	100	0	0	0

1.3 数据处理

采用Origin 2021软件绘制氨基酸色谱图,使用SPSS 26.0软件进行单因素方差分析(ANOVA)和系统聚类分析,并借助SIMAC 14.1软件开展正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)等化学模式识别分析。

1.4 OPLS-DA模型建立

为区分不同基原的象牙及仿制品样本,将56份样品的18种氨基酸含量数据导入SIMAC 14.1软件,以氨基酸含量作为因变量、样本类别作为自变量,采用OPLS-DA进行建模与化学模式识别。通过该模型,对非洲象牙、猛犸象牙、野猪牙、鹿骨与牛骨5类样本进行区分。为筛选关键差异氨基酸成分,进

一步利用变量重要性投影值(variable importance for the projection, VIP)对模型变量进行重要性评估与筛选。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 线性关系

分别准确移取氨基酸及相关含氮化合物混合标

准溶液(1 mmol/L) 0.01、0.02、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00、2.00 mL至10 mL容量瓶中,用样品稀释液溶解并定容,配制成不同质量浓度的系列标准溶液。按照1.2.3色谱条件进样分析,以各组分质量浓度为横坐标(X)、对应色谱峰面积为纵坐标(Y),绘制35种氨基酸及相关含氮化合物的标准曲线,其线性参数等见表2。结果表明,各组分在相应线性范围内 r^2 均大于等于0.999 1,线性关系良好。

表 2 35种氨基酸及相关含氮化合物的线性参数
Table 2 Linear parameters for 35 amino acids and related nitrogenous compounds

氨基酸及相关含氮化合物 Amino acids and related nitrogenous compounds	回归方程 Regression equation	r^2	线性范围 / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Linearity range	氨基酸及相关含氮化合物 Amino acids and related nitrogenous compounds	回归方程 Regression equation	r^2	线性范围 / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Linearity range
Ser-p	$Y = 318.50X + 74.09$	0.999 1	0.216 ~ 43.200	Leu	$Y = 606.64X - 34.03$	0.999 7	0.131 ~ 26.240
Tau	$Y = 584.65X + 32.24$	0.999 6	0.125 ~ 25.030	Tyr	$Y = 425.14X - 68.36$	0.999 4	0.181 ~ 36.240
PETH	$Y = 327.51X - 19.48$	0.999 8	0.141 ~ 28.212	Phe	$Y = 438.38X + 61.09$	0.999 3	0.165 ~ 33.040
Urea	$Y = 553.13X + 12.59$	0.999 5	0.060 ~ 12.012	β -Ala	$Y = 275.96X + 13.16$	0.999 6	0.089 ~ 17.818
Asp	$Y = 693.14X - 62.16$	0.999 6	0.133 ~ 26.620	β -Aiba	$Y = 265.98X - 19.76$	0.999 4	0.103 ~ 20.624
Thr	$Y = 77.06X - 45.97$	0.999 7	0.119 ~ 23.820	γ -Aba	$Y = 669.53X + 43.47$	0.999 6	0.103 ~ 20.620
Ser	$Y = 728.86X + 51.36$	0.999 6	0.105 ~ 21.020	His	$Y = 473.98X + 36.59$	0.999 3	0.155 ~ 31.040
Asn	$Y = 383.94X - 8.18$	0.999 2	0.132 ~ 26.424	3-MeHis	$Y = 409.06X - 27.18$	0.999 5	0.169 ~ 33.836
Glu	$Y = 545.52X - 88.68$	0.999 3	0.147 ~ 29.420	1-MeHis	$Y = 374.78X + 16.34$	0.999 2	0.169 ~ 33.836
α -Aaa	$Y = 476.95X - 49.87$	0.999 5	0.144 ~ 28.804	carnosine	$Y = 233.85X + 50.20$	0.999 3	0.226 ~ 45.246
Gly	$Y = 1\,014.00X - 17.93$	0.999 4	0.0751 ~ 15.020	Trp	$Y = 286.91X + 62.93$	0.999 1	0.204 ~ 40.846
Ala	$Y = 850.85X - 18.61$	0.999 3	0.0891 ~ 17.820	Orn	$Y = 547.10X + 63.90$	0.999 4	0.149 ~ 29.838
Cit	$Y = 471.39X + 64.19$	0.999 6	0.175 ~ 35.038	Lys	$Y = 510.03X - 26.50$	0.999 8	0.146 ~ 29.240
α -Aba	$Y = 741.98X + 63.15$	0.999 3	0.103 ~ 20.624	Ammonia	$Y = 5\,525.90X + 83.22$	0.999 2	0.017 ~ 3.406
Val	$Y = 649.68X + 39.30$	0.999 5	0.117 ~ 23.440	Arg	$Y = 388.82X - 18.75$	0.999 4	0.174 ~ 34.840
Cys ₂	$Y = 342.26X + 42.58$	0.999 2	0.240 ~ 48.060	Hyp	$Y = 64.16X + 5.74$	0.999 1	0.131 ~ 26.220
Met	$Y = 503.54X + 71.99$	0.999 1	0.149 ~ 29.840	Pro	$Y = 140.82X - 2.14$	0.999 6	0.115 ~ 23.020
Ile	$Y = 594.63X - 36.97$	0.999 8	0.131 ~ 26.240				

2.1.2 重复性试验

取同一非洲象牙样本(J1)6份,按1.2.1方法制备样品溶液,按1.2.3色谱条件测定样品中18种氨基酸的平均含量,并计算各组分含量的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),结果见表3。所有目标氨基酸的RSD均介于0.43%~2.26%($n=6$),表明本方法的重复性良好。

2.1.3 加标回收率与精密度试验

为考察方法的准确度与精密度,取非洲象牙样本J1分装为6份平行样品(每份0.1 g),分别添加低(1.5 nmol/mL)、中(10.0 nmol/mL)和高(150.0 nmol/mL)3个水平的混合标准溶液,按1.2.1方法制备样品溶液,再按1.2.3色谱条件进行测定分析,分别计算35种目标组分的加标回收率和精密度(以相对标准

表3 重复性试验结果(非洲象牙J1样本, $n=6$)
Table 3 Results of repeatability test (African ivory sample J1, $n=6$)

氨基酸 Amino acid	平均质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Average mass fraction	相对标准偏差/% RSD	氨基酸 Amino acid	平均质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Average mass fraction	相对标准偏差/% RSD
Asp	16.08	0.71	Ile	3.94	2.18
Thr	6.67	1.32	Leu	10.78	0.92
Ser	12.54	1.09	Tyr	0.52	1.33
Glu	32.67	0.43	Phe	6.09	1.54
Gly	73.27	2.26	His	1.56	1.11
Ala	30.36	0.95	Lys	8.34	1.40
Val	7.94	1.87	Arg	21.76	1.59
Cys ₂	0.45	1.14	Hyp	38.12	1.81
Met	1.69	1.60	Pro	43.17	1.28

偏差RSD表示)。结果显示,各组分在不同加标水平下的回收率为90.67%~101.35%,RSD为1.07%~1.94%,精密度RSD为0.52%~1.94%,表明该方法的准确度和精密度均良好。

2.2 样品含量测定

按照1.2.1方法制备样品溶液,并依据1.2.3色谱条件检测样品中的氨基酸含量。每份样品平行测定3次,结果取平均值作为该样品中各氨基酸组分

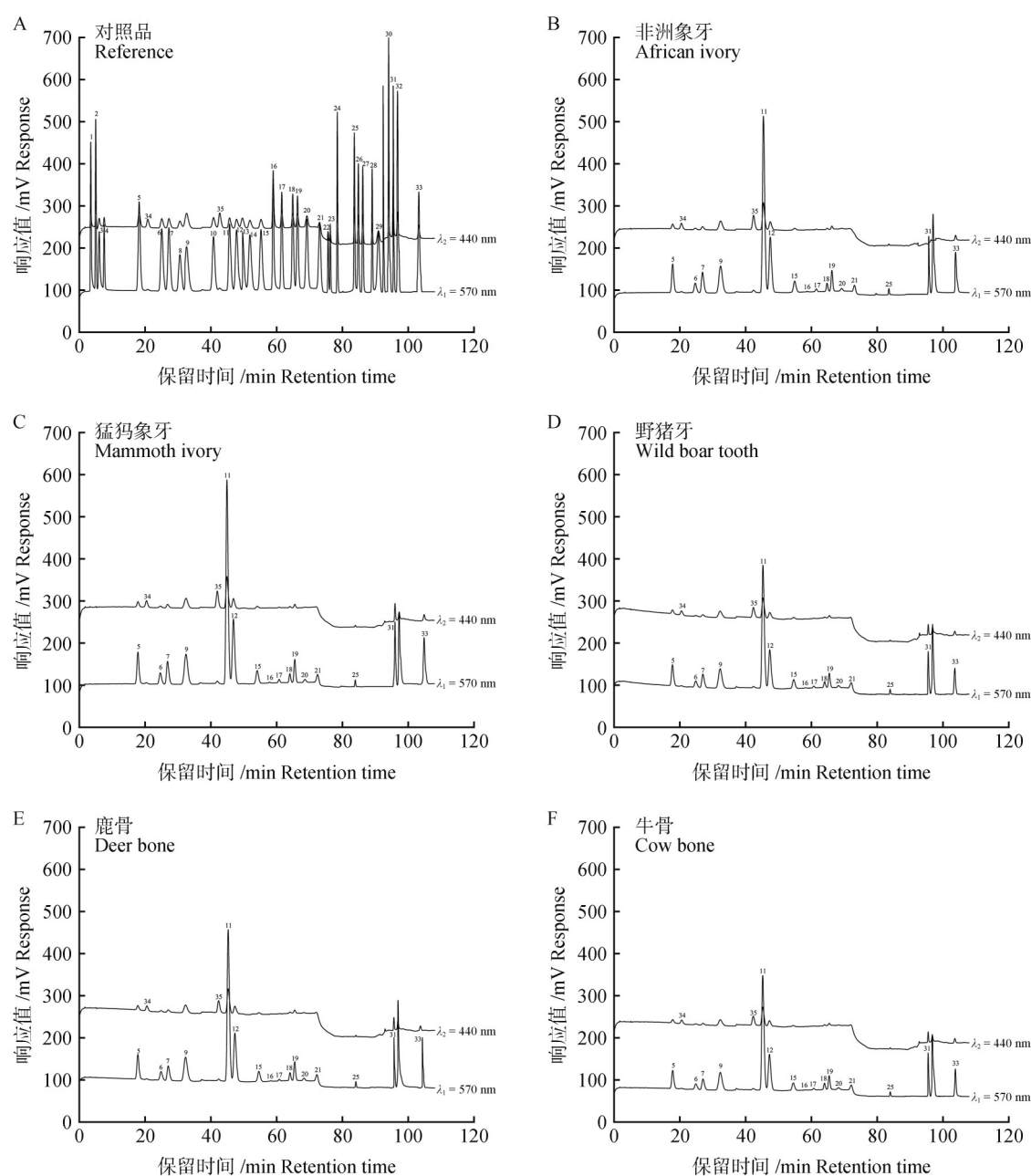
的最终含量。氨基酸混合对照品与样品的色谱分离图见图1。在56份象牙及其仿制品样本中共稳定检出18种氨基酸,含量测定结果见表4。依据氨基酸功能与结构特征,将其划分为酸性氨基酸(Asp、Glu)、中性氨基酸(Thr、Ser、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Tyr、Phe)、碱性氨基酸(His、Lys、Arg)、含硫氨基酸(Cys₂、Met)和亚氨基酸(Hyp、Pro)五类。

表4 象牙及其仿制品样本中18种氨基酸的含量测定结果($n=3$)
Table 4 Determination results of 18 amino acids in ivory and imitation samples($n=3$)

样本类型 Sample type	样本编号 Sample number	氨基酸质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Amino acid mass fraction																	
		Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Cys ₂	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Hyp	Pro
非洲象牙 African ivory	J1	16.08	6.67	12.54	32.67	73.27	30.36	7.94	0.45	1.69	3.94	10.78	0.52	6.09	1.56	8.34	21.76	38.12	43.17
	J2	15.62	6.49	12.15	32.09	71.38	29.32	8.21	0.51	1.71	4.30	10.61	2.60	6.09	2.01	11.76	26.54	36.40	43.27
	J3	15.84	6.10	11.94	31.52	70.33	29.40	8.11	0.53	1.66	3.99	10.30	2.79	5.73	2.15	11.90	26.90	37.60	44.34
	J4	15.92	6.59	12.37	32.43	70.73	28.94	8.32	0.43	1.75	4.10	10.83	2.66	6.28	2.11	12.04	24.39	36.40	42.14
	J5	15.44	6.43	12.16	31.93	71.33	29.19	8.09	0.40	2.00	3.70	10.26	2.15	6.22	1.77	10.66	22.69	37.18	42.61
	J6	15.47	6.40	12.18	32.08	71.25	29.18	8.30	0.43	1.71	3.79	10.29	1.47	6.12	1.61	9.02	23.95	37.48	43.03
	J7	15.21	6.35	11.67	31.56	68.72	27.91	8.03	0.41	1.44	3.76	10.15	2.14	6.42	1.89	10.98	25.64	35.15	40.86
	J8	15.74	6.57	12.09	32.54	71.18	30.31	7.98	0.38	2.03	4.08	10.98	2.45	6.62	1.70	11.11	24.26	36.70	41.51
	J9	15.89	6.66	12.38	32.58	72.16	30.47	8.26	0.44	1.23	4.01	10.86	2.40	6.57	2.08	12.14	25.37	38.57	42.70
	J10	15.40	6.37	11.98	31.69	71.34	30.30	8.05	0.47	1.38	3.56	10.42	2.44	6.56	1.98	12.23	23.56	36.38	42.20
	J11	14.79	6.14	11.57	31.03	68.82	29.33	7.85	0.26	1.28	3.59	9.98	2.39	6.22	1.73	10.73	24.45	35.73	40.88
	J12	14.85	6.20	11.52	31.43	69.43	29.40	8.01	0.26	0.95	3.78	10.19	2.60	6.14	1.51	7.61	24.50	35.83	41.44
	J13	15.09	6.36	12.10	31.63	69.88	29.68	8.13	0.22	1.51	3.85	10.35	2.60	6.08	1.90	11.33	23.59	37.75	41.26
	J14	15.74	6.05	11.90	31.33	68.94	29.46	7.94	0.37	1.55	3.83	10.05	2.11	6.80	2.25	11.04	24.93	35.30	42.14
	J15	15.45	6.49	12.15	31.76	69.9	29.74	8.08	0.44	1.88	4.00	10.72	2.49	6.11	2.15	12.04	23.09	35.79	41.88
均值Mean		15.50	6.39	12.05	31.88	70.58	29.53	8.09	0.40	1.58	3.89	10.45	2.25	6.27	1.89	10.86	24.37	36.69	42.23

续表 4

样本类型 Sample type	样本编号 Sample number	氨基酸质量分数/(mg·g ⁻¹) Amino acid mass fraction																	
		Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Cys ₂	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Hyp	Pro
猛犸象牙 Mammoth ivory	M60	14.28	5.81	10.56	29.27	64.74	27.58	7.80	0.43	1.65	3.44	9.47	2.07	7.28	1.42	12.10	24.70	33.38	40.28
	M61	13.77	5.24	10.19	29.14	65.73	28.15	7.42	0.30	1.83	3.96	9.45	2.46	7.98	2.17	11.39	25.39	34.37	40.11
	M62	14.26	5.66	10.50	29.82	66.95	28.19	7.90	0.31	1.61	3.40	9.40	2.19	7.32	1.75	11.29	25.11	34.76	40.48
	M63	14.35	5.92	10.90	30.15	68.98	28.81	7.83	0.25	1.64	3.44	9.39	1.77	8.85	1.65	12.33	24.75	34.19	39.69
	M64	14.18	5.79	10.79	29.63	67.74	28.31	7.62	0.19	1.35	3.40	9.10	1.41	7.20	1.54	12.20	24.08	33.84	40.17
	M65	14.08	5.39	10.29	29.20	66.96	29.04	7.11	0.26	1.40	3.75	9.02	2.03	7.68	1.80	12.35	25.13	33.70	40.46
	M66	14.45	5.33	10.90	28.81	67.48	28.64	6.88	0.33	1.76	3.85	8.86	1.59	8.37	1.59	12.17	24.52	33.01	40.26
	M67	14.19	5.51	10.31	28.96	65.62	26.75	7.76	0.40	1.56	3.39	9.05	1.62	7.35	1.59	11.71	24.54	32.96	39.46
	M68	13.68	5.77	10.47	28.75	64.15	27.46	7.74	0.33	1.82	3.37	9.09	1.90	7.78	1.77	10.85	23.10	34.00	38.10
	M69	14.46	5.61	11.01	29.39	66.54	29.32	7.58	0.26	1.58	3.79	9.37	2.15	8.27	2.38	12.93	24.27	35.24	40.64
	M70	15.12	5.70	10.86	28.31	64.66	28.70	7.17	0.30	0.95	4.09	9.81	2.40	9.21	1.57	12.58	23.87	34.57	39.58
	M71	13.46	5.41	10.23	27.69	61.63	25.46	7.14	0.17	1.54	3.21	8.79	1.06	7.17	0.95	10.25	21.88	32.87	38.03
	M72	14.48	5.36	10.66	29.86	66.83	26.36	7.04	0.39	1.76	3.76	9.73	2.01	8.00	1.43	12.10	23.76	33.31	40.18
	M73	13.67	5.35	9.94	27.89	62.63	26.15	6.91	0.16	1.58	3.04	8.32	1.42	6.53	1.57	10.92	22.03	33.48	37.77
	M74	13.63	5.48	10.49	29.09	65.75	27.27	7.51	0.23	1.27	3.28	8.97	1.73	7.16	1.30	11.72	23.98	33.24	38.39
	M75	14.32	5.86	10.41	29.70	64.94	28.01	6.57	0.57	1.71	4.04	9.20	2.01	7.56	2.20	12.14	23.21	33.99	40.56
	均值 Mean	14.15	5.57	10.53	29.10	65.71	27.76	7.37	0.31	1.56	3.58	9.19	1.86	7.73	1.67	11.81	24.02	33.81	39.64
野猪牙 Wild boar tooth	Y1	14.21	4.84	9.60	26.66	60.23	25.13	6.96	0.72	1.54	3.34	8.66	2.20	9.66	2.53	8.58	17.35	29.16	31.88
	Y2	15.59	5.14	10.48	30.37	66.11	28.29	7.93	0.67	1.07	3.94	8.64	2.40	10.45	2.79	8.34	16.86	29.26	32.66
	Y3	14.52	5.77	9.45	25.24	69.67	26.47	6.71	0.43	1.30	3.97	8.19	2.45	10.50	2.64	8.58	17.17	28.29	32.21
	Y4	15.52	5.65	10.13	29.71	64.46	27.20	7.89	0.78	0.97	3.83	9.47	2.45	10.30	2.72	9.18	19.18	28.17	33.95
	Y5	14.09	4.89	9.80	25.97	67.78	27.10	6.84	0.38	1.23	3.17	7.93	2.08	9.44	2.30	8.94	18.36	29.41	32.81
	Y6	14.43	4.39	9.28	27.84	65.88	26.11	6.69	0.52	1.34	2.99	7.74	1.90	9.81	2.30	8.15	17.72	29.00	31.96
	Y7	14.61	5.56	9.43	27.58	63.48	26.55	7.82	0.47	1.15	3.65	9.36	2.43	8.11	2.67	9.05	17.76	28.79	33.73
	Y8	14.10	5.20	9.07	27.12	61.50	26.19	7.18	0.78	0.86	3.14	8.15	1.99	9.16	2.75	8.17	17.37	29.43	30.92
	Y9	14.50	4.61	9.07	25.59	64.72	26.87	6.51	0.64	1.27	3.01	7.69	1.97	9.11	2.91	8.43	18.39	29.11	33.13
	均值 Mean	14.62	5.12	9.59	27.34	64.87	26.66	7.17	0.60	1.19	3.45	8.43	2.21	9.62	2.62	8.60	17.80	28.96	32.58
鹿骨 Deer bone	L1	16.58	6.89	10.17	32.33	72.43	30.49	7.96	0.58	1.20	4.44	10.79	2.76	10.58	2.66	11.20	20.62	31.87	35.10
	L2	16.5	7.01	10.6	32.21	72.32	30.11	8.40	0.72	1.34	4.61	10.40	2.32	10.89	2.74	11.32	20.90	31.26	37.61
	L3	16.20	6.73	10.41	32.02	72.84	30.77	7.83	0.48	0.97	4.35	10.38	2.11	10.31	2.20	11.02	20.21	31.56	37.26
	L4	16.17	6.79	10.43	32.08	72.63	30.17	8.71	0.57	1.31	4.11	10.87	2.84	10.22	2.45	11.53	20.72	32.03	36.39
	均值 Mean	16.36	6.86	10.40	32.16	72.56	30.39	8.23	0.59	1.21	4.38	10.61	2.51	10.50	2.51	11.27	20.61	31.68	36.59
牛骨 Cow bone	N1	12.09	4.88	7.34	26.44	57.66	24.61	6.65	0.20	0.59	4.07	7.93	1.93	9.82	1.22	8.71	17.60	27.14	30.52
	N2	13.97	4.79	8.08	26.81	59.72	24.82	6.51	0.27	0.58	3.98	8.57	1.73	9.71	1.13	8.98	18.54	28.11	30.21
	N3	13.53	4.78	7.81	26.14	57.50	23.77	6.43	0.21	0.82	4.00	8.32	1.82	9.55	1.34	9.10	18.56	27.95	29.70
	N4	13.00	4.52	7.52	25.17	55.69	22.93	6.18	0.40	0.57	3.72	7.85	1.77	9.23	1.08	8.13	17.12	25.86	29.84
	N5	13.20	4.91	7.72	26.84	56.38	24.30	6.23	0.30	0.58	4.07	8.11	1.79	8.90	1.15	8.57	18.18	27.58	30.10
	N6	12.93	4.57	8.17	25.21	55.25	22.78	6.02	0.43	0.50	3.75	7.90	1.76	9.44	1.17	8.45	16.78	26.26	28.61
	N7	13.01	5.04	8.03	26.72	58.23	24.51	6.73	0.36	0.88	3.98	8.01	2.02	8.62	2.04	9.01	17.48	26.61	29.26
	N8	13.81	5.11	8.14	26.59	58.61	24.70	6.69	0.43	0.84	4.10	8.02	2.11	8.72	1.91	8.86	16.90	25.92	30.57
	N9	12.11	4.56	7.60	24.28	54.66	22.43	5.77	0.35	1.12	3.56	7.82	2.27	8.79	1.82	8.62	18.03	27.78	28.09
	N10	12.90	4.91	8.19	26.21	59.76	25.68	6.42	0.38	0.72	3.95	8.48	2.30	9.48	2.14	9.18	17.93	27.32	30.27
	N11	12.77	4.66	7.74	25.56	56.86	23.63	6.21	0.26	0.47	3.82	8.04	1.92	9.76	2.11	8.49	18.44	26.54	30.43
	N12	12.62	4.59	7.63	25.18	55.67	23.25	6.21	0.36	0.77	3.71	8.05	2.06	9.63	2.06	8.19	18.19	26.56	29.71
	均值 Mean	13.00	4.78	7.83	25.93	57.17	23.95	6.34	0.33	0.70	3.89	8.09	1.96	9.30	1.60	8.69	17.81	26.97	29.78



1. Ser-p; 2. Tau; 3. PETH; 4. Urea; 5. Asp; 6. Thr; 7. Ser; 8. Asn; 9. Glu; 10. α -AAA; 11. Gly; 12. Ala; 13. Cit; 14. α -ABA; 15. Val; 16. Cys; 17. Met; 18. Ile; 19. Leu; 20. Tyr; 21. Phe; 22. β -Ala; 23. β -Aiba; 24. γ -Aba; 25. His; 26. 3-MeHis; 27. 1-MeHis; 28. carnosine; 29. Trp; 30. Orn; 31. Lys; 32. Ammonia; 33. Arg; 34. Hyp; 35. Pro.

图1 氨基酸混合对照品与象牙及其仿制品样本的色谱分离

Figure 1 Chromatographic separation profiles of amino acid mixed reference standards and samples of ivory and imitations

在酸性氨基酸中, Asp 含量从高到低排序为鹿骨、非洲象牙、野猪牙、猛犸象牙和牛骨, Glu 含量的排序为鹿骨、非洲象牙、猛犸象牙、野猪牙和牛骨。酸性氨基酸(Asp 与 Glu 含量之和)整体排序为鹿骨、非洲象牙、猛犸象牙、野猪牙和牛骨, 呈现鹿骨最高、牛骨最低的趋势, 非洲象牙酸性氨基酸(Asp、Glu)的含量整体处于适中位置, 含量略高于猛犸象牙。

在碱性氨基酸中, His 含量从高到低排序为野猪牙、鹿骨、非洲象牙、猛犸象牙和牛骨, Lys 含量的排序为猛犸象牙、鹿骨、非洲象牙、牛骨和野猪牙, Arg 含量的排序为非洲象牙、猛犸象牙、鹿骨、野猪牙和牛骨。碱性氨基酸(His、Lys 与 Arg 含量之和)整体排序为猛犸象牙、非洲象牙、鹿骨、野猪牙和牛骨, 呈现猛犸象牙最高、牛骨最低的趋势, 非洲象牙碱性

氨基酸的含量整体处于适中位置,含量略低于猛犸象牙。

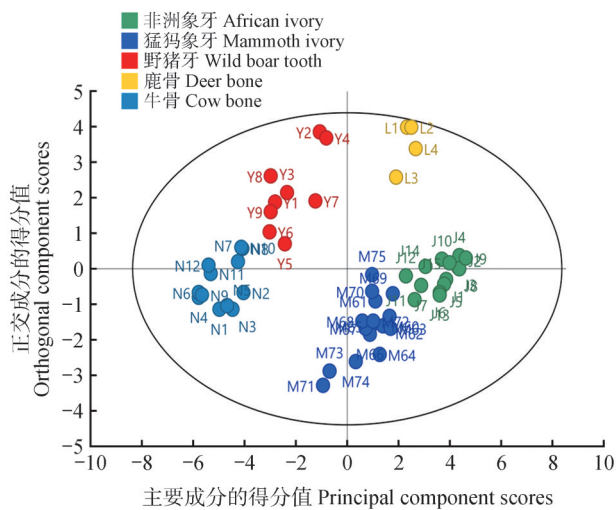
除上述酸性氨基酸和碱性氨基酸外,Ser、Hyp和Pro含量排序整体表现为非洲象牙、猛犸象牙、鹿骨、野猪牙和牛骨的趋势,在猛犸象牙样本中这3种氨基酸相对于非洲象牙有所降低,其中,Hyp、Pro是胶原蛋白的特征性氨基酸,该类氨基酸的高含量是象牙结构致密、韧性强的关键原因,其含量差异或为猛犸象牙与非洲象牙蛋白质组成或结构的核心区别之一,推测与物种进化及保存环境的细微影响有关。

总体而言,各类样本氨基酸总量由高到低依次为非洲象牙、鹿骨、猛犸象牙、野猪牙和牛骨;非洲象牙与猛犸象牙的氨基酸组成高度同源;鹿骨的氨基酸含量全面优于牛骨,反映了不同动物骨骼的功能适应性差异。

2.3 化学模式分析

2.3.1 OPLS-DA 模型建立及分析

采用 OPLS-DA 对 56 份样本的氨基酸含量数据进行建模,以揭示不同基原样本的区分模式。模型拟合结果(图 2)显示,自变量(X 矩阵)总解释率(R^2X)为 0.872,因变量(Y 类别)解释率(R^2Y)为 0.801。其中,第一预测成分($t[1]$)对 X 矩阵的解释度($R^2X[1]$)为 0.599,表明该成分提取了与类别相关的主要化学变异;第二正交成分($t_o[1]$)的解释度($R^2X[2]$)为 0.167,主要反映与分类无关的系统波动。模型得分见图 2,椭圆表示 95% 置信区间的霍特林 T^2 分布。



$R^2X[1] = 0.599$; $R^2X[2] = 0.167$; Ellipse: Hotelling's T^2 (95%)。

图2 象牙及其仿制品中 OPLS-DA 得分

Figure 2 Scores of OPLS-DA in ivory and imitations

通过 200 次置换检验评估模型预测能力与稳健性。模型预测指数(Q^2)为-0.241 且 Q^2 回归线与纵轴的交点小于 0(图 3),说明模型不存在过拟合,建立的模型稳定且验证有效,可用于非洲象牙和猛犸象牙与其仿制品的鉴别分析。

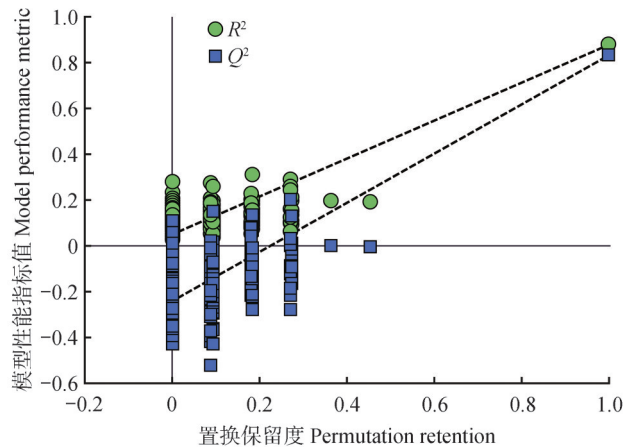


图3 OPLS-DA 模型交叉验证结果

Figure 3 Results of permutation test of the OPLS-DA model

OPLS-DA 分类结果较为显著,充分说明非洲象牙、猛犸象牙、牛骨、鹿骨和野猪牙 5 类基原的氨基酸存在一定的差异(图 2)。以 $VIP > 1.0$ 为标准,共筛选出 5 种对区分 5 类样本贡献最大的关键氨基酸,按其 VIP 值降序依次为 Ile、Phe、Lys、His 和 Cys₂(图 4)。这些成分可作为区分象牙及其仿制品的潜在化学标志物。

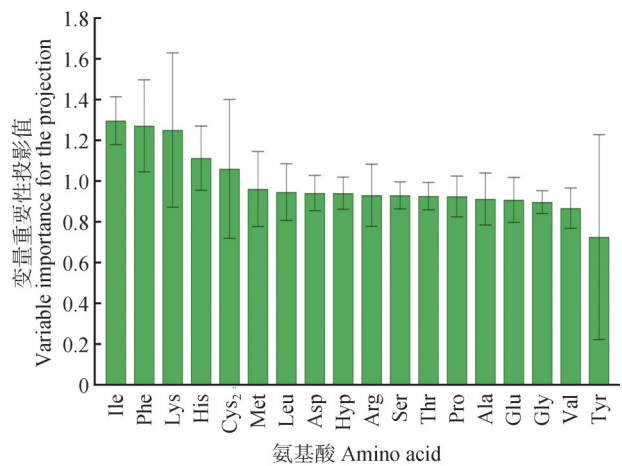


图4 OPLS-DA 模型的 VIP 值

Figure 4 VIP plot of OPLS-DA model

2.3.2 单因素方差分析

运用 SPSS 26.0 软件对 OPLS-DA 模型筛选出的 5 种差异氨基酸在不同基原间的含量进行单因素方差分析,结果如表 5 所示:鹿骨中 Ile 和 Phe 的平均含

量均显著高于其他4类基原样品($P < 0.05$),可作为区分象牙与鹿骨仿制品的差异性标志物之一;猛犸象牙中 Lys 的平均含量最高,与非洲象牙、野猪牙和牛骨均具有显著差异($P < 0.05$),Lys 可作为非洲象牙与猛犸象牙的鉴别标志物;野猪牙中 His 的平均含量最高,与非洲象牙、猛犸象牙和牛骨差异显著($P < 0.05$),可作为区分象牙与野猪牙仿制品及野猪牙与牛骨仿制品的差异性标志物之一;而 Cys₂ 的平均含量在非洲象牙、猛犸象牙和牛骨中较为接近,

在野猪牙和鹿骨中也呈现相似水平。5种氨基酸的总含量均值从高到低依次为鹿骨、猛犸象牙、野猪牙、牛骨和非洲象牙,鹿骨总含量均值显著高于其他样品($P < 0.05$);野猪牙、猛犸象牙总含量均值无显著性差异,但都显著高于非洲象牙($P < 0.05$);牛骨总含量均值与非洲象牙、猛犸象牙及野猪牙之间均无显著性差异,处于中间水平,表明不同基原样本在关键氨基酸组成上具有整体差异性。

表5 象牙及其仿制品中差异标志物的平均含量($n = 3$)
Table 5 The average content of differential biomarkers in ivory and imitations ($n = 3$)

样本类型 Sample type	标志物质量分数 Biomarker mass fraction					总质量分数 Total mass fraction
	Ile	Phe	Lys	His	Cys ₂	
非洲象牙 African ivory	3.89 ± 0.02 ^b	6.27 ± 0.03 ^d	10.86 ± 0.14 ^b	1.89 ± 0.02 ^b	0.40 ± 0.01 ^b	23.31 ± 0.15 ^c
猛犸象牙 Mammoth ivory	3.58 ± 0.03 ^c	7.73 ± 0.07 ^c	11.81 ± 0.07 ^a	1.67 ± 0.04 ^b	0.31 ± 0.01 ^b	25.10 ± 0.11 ^b
野猪牙 Wild boar tooth	3.45 ± 0.04 ^c	9.62 ± 0.08 ^b	8.60 ± 0.04 ^c	2.62 ± 0.02 ^a	0.60 ± 0.02 ^a	24.89 ± 0.10 ^b
鹿骨 Deer bone	4.38 ± 0.02 ^a	10.50 ± 0.03 ^a	11.27 ± 0.02 ^{ab}	2.51 ± 0.02 ^a	0.59 ± 0.01 ^a	29.25 ± 0.05 ^a
牛骨 Cow bone	3.89 ± 0.02 ^b	9.30 ± 0.04 ^b	8.69 ± 0.03 ^c	1.60 ± 0.04 ^b	0.33 ± 0.01 ^b	23.81 ± 0.07 ^{bc}

注：同列不同小写字母表示样品间在 $\alpha = 0.05$ 水平差异显著。
Note: Different small letters in the same column indicate significant difference among different samples at $\alpha = 0.05$ level.

2.3.3 系统聚类分析

基于56份样本的18种氨基酸含量数据,采用组间联接法进行系统聚类分析,并绘制树状图(图5)。由图5可见,随着欧几里得距离阈值的减小,样本逐步细分:在欧几里得距离为10时,全部样本被分为2类,牛骨和野猪牙聚为一类,鹿骨、非洲象牙和猛犸象牙聚为一类;在欧几里得距离约为8时,样本进一步分为4类,牛骨、野猪牙和鹿骨各自聚为一类,而所有非洲象牙和猛犸象牙样本则聚为一类;在欧几里得距离为5时,样本被分为5类。牛骨、野猪牙、鹿骨、非洲象牙和猛犸象牙各自聚为一类,表明其氨基酸组成具有明显的类别特征,聚类结果与 OPLS-DA 分类一致。

3 讨论

氨基酸的组成种类和含量差异直接决定了蛋白质的结构与功能特性,也是实现物种特异性鉴别的关键化学依据。象牙及其仿制品在形态上往往相似,但其蛋白质组成尤其是胶原蛋白的氨基酸模式可能因物种、组织类型及演化历史而具有特异性。

因此,建立基于氨基酸组分的标准化检测方法,明确非洲象牙、猛犸象牙及其常见仿制品(如鹿骨、牛骨和野猪牙)之间的氨基酸差异,并将其与形态学、显微结构等传统鉴别方法相结合,有助于构建更为系统、可靠的鉴别体系,从而更好地服务于非法贸易监管和濒危物种保护的实际需求。

本研究首先建立了稳定可靠的氨基酸测定方法,在线性范围、重复性、精密性及回收率等方面均表现良好,能满足象牙及其仿制品中氨基酸成分的定量分析需求。在此基础上,引入化学模式识别模型,通过 OPLS-DA 模型和系统聚类分析,实现了5类基原样本的有效区分。OPLS-DA 模型在解释率($R^2X = 0.872, R^2Y = 0.801$)与预测稳健性(置换检验验证无过拟合)方面表现良好,其得分图清晰呈现各类样本的独立聚类,同时筛选出 Ile、Phe、Lys、His 和 Cys₂ 五种对分类贡献最大的差异标志物(VIP > 1)。系统聚类分析结果进一步支持上述结论,在欧几里得距离为5时样本自然分为5类,与 OPLS-DA 分类高度一致,说明不同基原在氨基酸整体组成上具有可区分的化学特征。

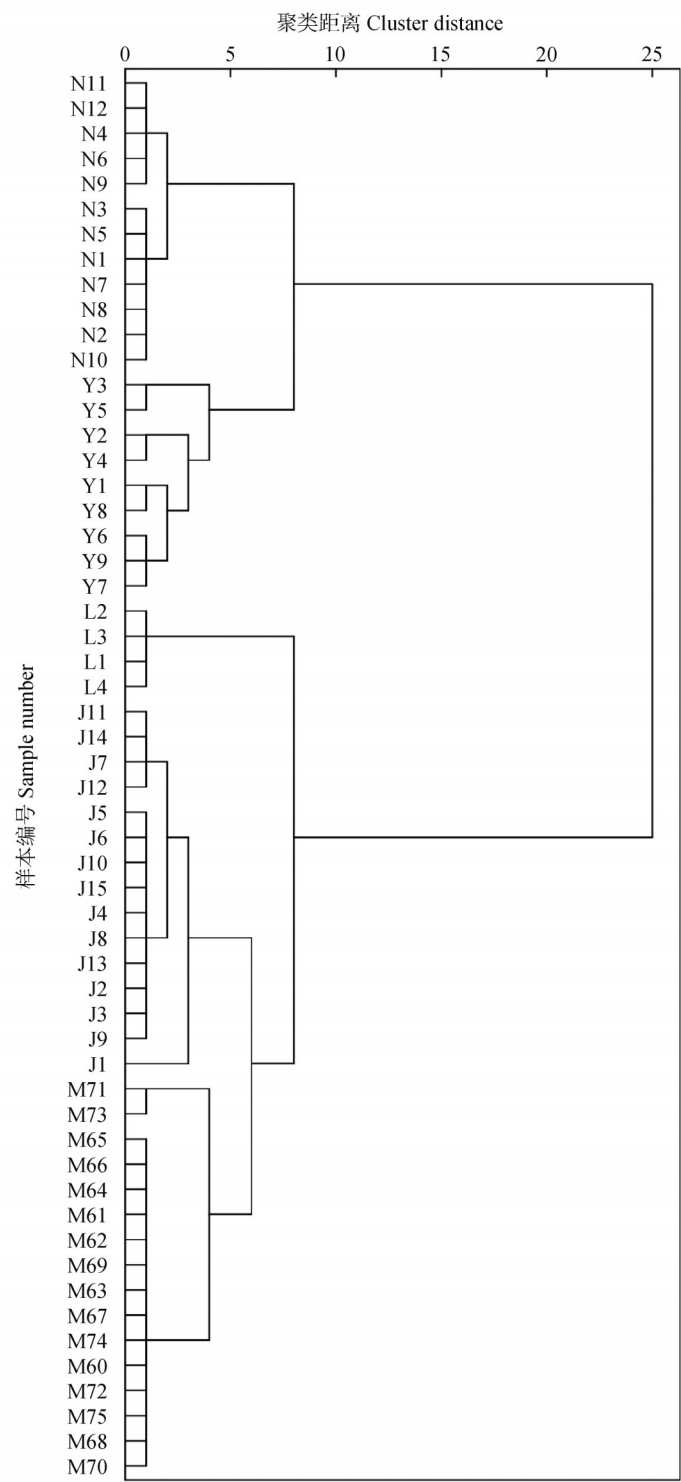


图5 基于18种氨基酸含量的56份象牙及其仿制品样本系统聚类分析结果

Figure 5 Dendrogram of hierarchical cluster analysis for 56 ivory and imitation samples based on the contents of 18 amino acids

从具体氨基酸组成模式来看,非洲象牙中 Ser、Pro 和 Hyp 等含量较高,酸性氨基酸(Asp、Glu)含量适中,整体组成较为均衡(表2);而猛犸象牙样本的 Ser、Pro 和 Hyp 含量相对于非洲象牙有所降低,这可能表明其在蛋白质组成或结构上与非洲象牙存在差

异;野猪牙、鹿骨和牛骨样本的氨基酸组成模式各具特点,与非洲象牙和猛犸象牙亦不同,表现出了不同物种间蛋白质结构的特异性。氨基酸含量水平的差异在一定程度上反映出了氨基酸组成模式与物种生态适应性的关联度,这些差异不仅为物种鉴别提供

了潜在的分子指纹信息,也可能为未来研究不同物种牙骨质/骨质的生物演化与功能适应性差异提供化学组成的参考依据。但因实验材料所限,本次研究仅以氨基酸分析作为象牙鉴别的初步探索,纳入的样本种类和数量不够丰富,如缺少海象牙、亚洲象牙和河马牙等牙类材料,且上述分析是建立在已知样本种类的前提下进行的研究,而对于未知种类样本的氨基酸组成模式是否会造成鉴别干扰,仍需后续研究进一步拓展和验证。

4 结论

本研究对非洲象牙、猛犸象牙、鹿骨、牛骨和野猪牙5类基原共56份样本中氨基酸类成分及含量进行了测定,共检出18种氨基酸。所建立的氨基酸检测方法重复性、线性、精密度和回收率均良好,可用于象牙及其仿制品中氨基酸类的检测分析。在化学模式识别方面,本研究结合OPLS-DA、方差分析和系统聚类分析识别法实现了对5类基原样本的有效区分,表明不同基原间的氨基酸组成存在一定的差异性。其中,OPLS-DA模型筛选出Ile、Phe、Lys、His和Cys₂五个差异性指标成分。这5种氨基酸的总含量均值在鹿骨中最高,其次为猛犸象牙,非洲象牙平均含量最低。系统聚类分析在欧几里得距离为5时将56份基原样本分为5类,结果与OPLS-DA模型一致。综上,本研究基于氨基酸成分结合化学计量学方法,为象牙及其仿制品的鉴别分析提供了新的分析思路 and 科学依据,并为后续相关牙骨制品的鉴别研究与技术开发奠定了方法基础。

参考文献:

- [1] Gao Y F, Clark S G. Elephant ivory trade in China: trends and drivers [J]. *Biological Conservation*, 2014, 180: 23–30.
- [2] 卢琳琳, 季伟, 梦梦, 等. 欧美日象牙贸易市场调研与分析 [J]. *野生动物学报*, 2020, 41(4): 1113–1120.
Lu Linlin, Ji Wei, Meng Meng, et al. Research and analysis of European, American and Japanese ivory trade markets [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2020, 41(4): 1113–1120.
- [3] 管海欣, 刘大伟. 我国非法象牙贸易犯罪侦防对策研究 [J]. *四川动物*, 2020, 39(5): 592–600.
Guan Haixin, Liu Dawei. Investigation and prevention of illegal ivory trade crime in China [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2020, 39(5): 592–600.
- [4] 郭书林. 象牙及其制品鉴定方法适用性解析 [J]. *文物鉴定与鉴赏*, 2019(17): 82–84.
Guo Shulin. Applicability analysis of identification methods for ivory and its products [J]. *Identification and Appreciation to Cultural Relics*, 2019(17): 82–84.
- [5] 陆冠亚, 谭笑, 郝雨, 等. 象牙及相关牙骨制品的形态学鉴定要领 [J]. *中国口岸科学技术*, 2023, 5(4): 92–96.
Lu Guanya, Tan Xiao, Hao Yu, et al. Morphological identification of ivory and related odontobones products [J]. *China Port Science and Technology*, 2023, 5(4): 92–96.
- [6] 胡红. 象牙及其制品鉴定技术标准的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010: 18–68.
Hu Hong. Study on the technical standard of ivory and ivory products identification [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2010: 18–68.
- [7] 吴姗, 张明哲, 虞惠贞, 等. 基于近红外光谱的象牙鉴定 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2023, 43(8): 2397–2406.
Wu Shan, Zhang Mingze, Yu Huizhen, et al. Ivory identification based on near infrared spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2023, 43(8): 2397–2406.
- [8] Cartier L E, Krzemnicki M S, Gysi M, et al. A case study of ivory species identification using a combination of morphological, gemmological and genetic methods [J]. *The Journal of Gemmology*, 2020, 37(3): 282–297.
- [9] 陈华, 李取傲, 曹明灿, 等. 三星堆遗址出土饱水象牙文物的加固保护研究 [J]. *宝石和宝石学杂志(中英文)*, 2024, 26(5): 1–9.
Chen Huan, Li Qu'ao, Cao Mingcan, et al. A study on the reinforcement and protection of water-saturated Ivory artifacts unearthed from the Sanxingdui Site [J]. *Journal of Gems & Gemmology*, 2024, 26(5): 1–9.
- [10] 吴烨盛, 于志超, 马永旺, 等. 猛犸象牙“冻土料”与猛犸臼齿的形貌、化学成分及谱学特征研究 [J]. *宝石和宝石学杂志(中英文)*, 2024, 26(2): 23–30.
Wu Yesheng, Yu Zhichao, Ma Yongwang, et al. Morphology, chemical composition and spectral characteristic of “frozen soil material” mammoth ivory and mammoth molar [J]. *Journal of Gems & Gemmology*, 2024, 26(2): 23–30.
- [11] 孙雪莹, 何明跃, 吴金林. 象牙与猛犸象牙的成分特征对比分析[C]//2021年国际珠宝首饰学术交流会, 2021: 296–301.
Sun Xueying, He Mingyue, Wu Jinlin. Comparative analysis of chemical composition of ivory and mammoth ivory [C]// 2021 Proceedings of the International Jewelry and Jewelry Academic Exchange Conference, 2021: 296–301.
- [12] 苏倡, 高瑞芳, 陈进会, 等. 国境口岸截获象牙地理溯源分析初探 [J]. *野生动物学报*, 2022, 43(4): 907–917.
Su Chang, Gao Ruifang, Chen Jinhui, et al. A preliminary analysis of geographic traceability of ivory intercepted at frontier ports [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2022, 43(4): 907–917.