农药学学报 2025, 27(1): 126-137 http://www.nyxxb.cn
Chinese Journal of Pesticide Science E-mail: nyxuebao@263.net

·研究论文·

doi: 10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0115

糖类植物免疫诱抗剂制剂含量的几种比色分析方法适用性研究

高志强[#,1]，刘霁萱[#,1]，刘丰茂[*,1]，赵鹏跃[2]，郭 丹[3]，王文卓[4]

(1. 中国农业大学 理学院应用化学系农药创新中心，北京 100193；2. 中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193；3. 沈阳沈化院测试技术有限公司，沈阳 100021；4. 农业农村部农药检定所，北京 100125)

摘 要：鉴于当前糖类植物免疫诱抗剂产品质量分析检测方法研究相对匮乏，本研究系统评估了硫酸-苯酚法、硫酸-蒽酮法及 Elson-Morgan 法在多种糖类化合物检测中的适用性及影响因素，并建立了有效的比色分析方法。结果表明，三种比色法对葡萄糖、半乳糖醛酸和氨基葡萄糖呈现不同的响应性，单糖组成对比色法的选择尤为重要。以相应单糖组成的葡聚糖、多聚半乳糖醛酸和氨基寡糖素为代表聚糖化合物，通过优化比色反应条件，确立了适合的最佳检测条件。方法验证结果显示，各方法在其线性范围内均表现出优异的线性相关性 ($R^2 > 0.998$)、良好的重复性（相对标准偏差范围为 0.4%~0.9%) 及高回收率 (100%~101%)。结合离子色谱法揭示了当前低聚糖素制剂的有效成分为低聚氨基葡萄糖，并指出了当前登记资料中对于糖类有效成分界定不清晰的现状。最后，本研究确立并验证了用于香菇多糖、低聚糖素和几丁聚糖制剂的比色分析方法，结果均展现出了良好的线性关系、优异的重现性和高准确度，满足产品质量检测的方法要求。此研究为糖类植物免疫诱抗剂质量分析提供了策略与方法支持，有助于推动产业健康发展。

关键词: 植物免疫诱抗剂；糖类化合物；硫酸-苯酚法；硫酸-蒽酮法；Elson-Morgan 法

中图分类号：TQ450.7; O657.3 **文献标志码：**A

Evaluating the applicability of several colorimetric methods for analyzing sugar plant immunity inducer formulations

GAO Zhiqiang[#,1], LIU Jixuan[#,1], LIU Fengmao[*,1], ZHAO Pengyue[2], GUO Dan[3], WANG Wenzhuo[4]

(1. *Innovation Center for Pesticide*, *Department of Applied Chemistry*, *College of Science*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100193, *China*; 2. *Institute of Plant Protection*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*; 3. *Shenyang SYRICI Testing Co.*, *Ltd.*, *Shenyang* 100021, *China*; 4. *Institute for the Control of Agrochemicalsy*, *Beijing* 100125, *China*)

Abstract: Given the limited research on current methods for detecting the product quality of sugar-based plant immunity inducers, this study systematically evaluated the applicability and influencing factors of the sulfuric acid-phenol method, sulfuric acid-anthracenone method, and Elson-Morgan

收稿日期：2024-08-19；录用日期：2024-12-06；网络首发日期：2024-12-27.

Received: August 19, 2024; **Accepted:** December 6, 2024; **Published online:** December 27, 2024.

URL: https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0115
http://www.nyxxb.cn/cn/article/doi/10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0115

基金项目：农业标准制修订项目 (No.NYB-22335).

Funding: Supported by Agricultural Standards Revision Program (No. NYB-22335).

[#]并列第一作者 (Equal contribution)：高志强，E-mail：1175568925@qq.com.；刘霁萱，E-mail：1907923026@qq.com. [*]通信作者 (Corresponding author)：刘丰茂，E-mail：liufengmao@cau.edu.cn.

The authors declare that they have no competing interests.

method for detecting various sugar active ingredients in sugar plant immunity inducer formulations, and effective colorimetric methods were established. Results showed that the three colorimetric methods presented different responsiveness to glucose, galacturonic acid and glucosamine, and the composition of monosaccharides was particularly important for the selection of colorimetric methods. Dextran, polygalacturonic acid and oligosaccharins, which composed of the corresponding monosaccharides, were used as representative glycan compounds, and suitable methods for these polysaccharide compounds were established by optimizing the colorimetric conditions. Method validation results showed excellent linear correlation ($R^2 > 0.998$), good reproducibility (relative standard deviation range of 0.4%-0.9%) and high recoveries (100%-101%). Combined with ion chromatography, this study revealed that the active ingredients of current oligosaccharin formulations are oligo-glucosamine, and pointed out that the active ingredients of the sugar plant immunity inducers were not clearly defined in the current registration data. Furthermore, the present study established and validated the colorimetric methods for analyzing the fungous proteoglycan, oligosaccharins and chitosan formulations, and the methods presented good linearity, excellent reproducibility and high accuracy, which met the requirements for the product quality analysis methods of formulations. This study provides strategies and method support for the quality analysis of sugar plant immunity inducers and helps to promote the healthy development of related industries.

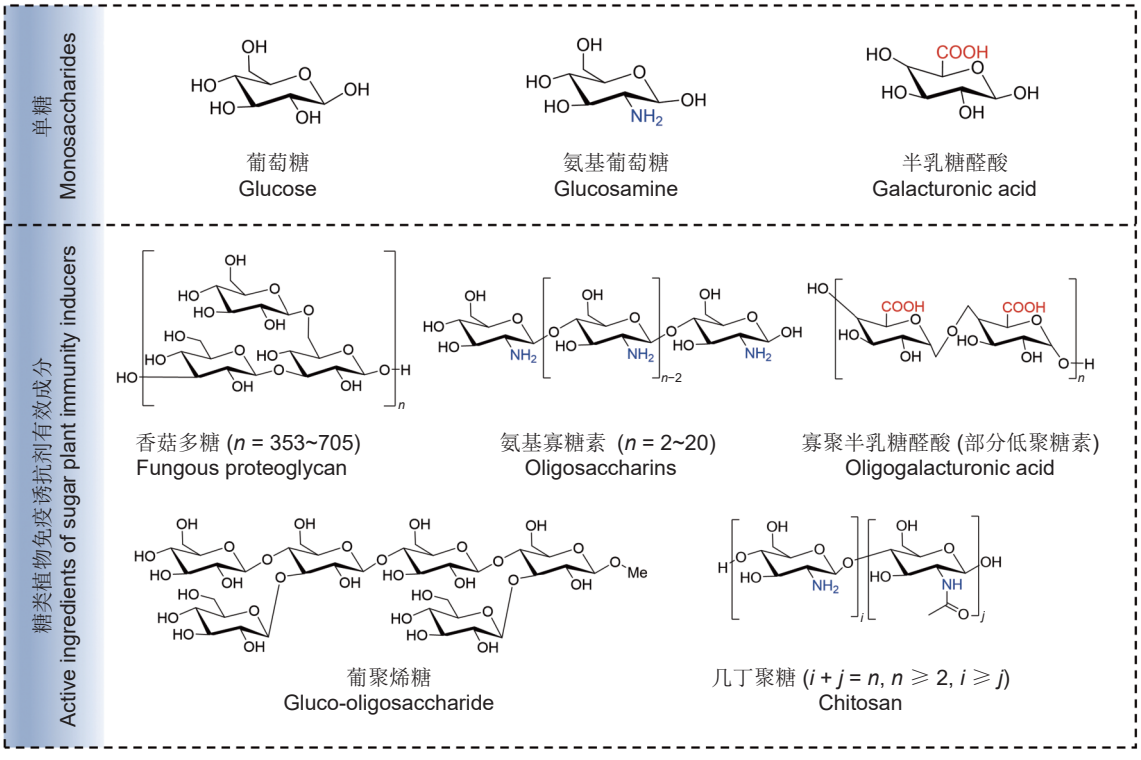
Keywords: sugar plant immunity inducers; polysaccharide; sulfuric acid-phenol method; sulfuric acid-anthrone method; Elson-Morgan method

植物免疫诱抗技术是一种新型绿色可持续的现代防控技术。它利用植物诱导免疫机制，通过施用蛋白类、糖类、有机活性小分子类或生防菌类等植物免疫诱抗剂，实现提高农作物的抗病性、抗逆能力，增加产量并提升品质，具有极大发展潜力[1–3]。其中，糖类植物免疫诱抗剂作为重要的植物免疫激发子，近年来取得了显著研究成果，特别是以氨基寡糖素为代表的糖类植物免疫诱抗剂，受到了研究人员和市场的广泛关注[4–8]。

从单糖组成的角度出发，我国当前登记的糖类植物免疫诱抗剂可划分为 3 类：葡萄糖聚合类的香菇多糖、葡聚烯糖等；氨基葡萄糖类的氨基寡糖素、几丁聚糖等；以及半乳糖醛酸类的寡聚半乳糖醛酸（部分低聚糖素登记的有效成分），部分化学结构式如图式 1 所示。截至 2024 年 5 月 1 日，我国登记的糖类植物免疫诱抗剂主要有氨基寡糖素 (121 个)、香菇多糖 (44 个)、几丁聚糖 (27 个)、低聚糖素 (16 个) 和葡聚烯糖 (6 个) [9]。然而，目前关于糖类植物免疫诱抗剂的定量分析方法报道较为有限，仅有氨基寡糖素和香菇多糖的相关产品含量分析方法，未见几丁聚糖、低聚糖素和葡聚烯糖等相关产品定量分析报道[10–13]。鉴于此，深入研究多种比色法在不同糖类化合物含量测定中的适用性，并据此构建适用于不同产品有效成分含量分析的检测方法，对于健全产品质量监管体系、保障产品质量稳定性、促进糖类植物免疫诱抗剂产业的健康发展具有深远意义。

糖类化合物常以混合物形式存在，其单糖组成、聚合单糖数量范围和糖苷键种类的多样性对糖类化合物的定性、定量分析提出了巨大挑战[14–16]。对糖类化合物进行定量分析时，通常将其水解生成单糖后，通过测定单糖对产品有效成分进行定量。检测方法主要有比色法、滴定法、气相色谱法、液相色谱法、离子色谱法、毛细管电泳法等。这些方法各有特点，例如气相色谱法、毛细管电泳法和部分液相色谱法需要衍生化处理，有些液相色谱法还需要不太常用的示差折光检测器或蒸发光散射检测器等辅助仪器，离子色谱法还需要价格昂贵的离子色谱柱和检测器，滴定法易受操作方法的影响等[15,17–21]。在实际应用中，比色法因检测快捷、准确度高、成本低廉且对设备要求低，仍具有一定的应用价值。

本研究主要聚焦于糖类植物免疫诱抗剂制剂含量的几种比色分析法的研究。当前，糖类物质的比色测定方法主要包括硫酸-蒽酮法、硫酸-苯酚法、Elson-Morgan 法等。在选择合适的比色分析方法时，糖类化合物的单糖组成被视为核心考量因素。具体而言，硫酸-蒽酮法与硫酸-苯酚法，鉴



图式 1　不同类型单糖和糖类植物免疫诱抗剂有效成分结构式

Scheme 1　Structures of different monosaccharides and active ingredients of sugar-based plant immunity inducers

于其对中性五碳糖及六碳糖的高度灵敏性，适用于以葡萄糖为单糖组成的糖类化合物的定量分析，而 Elson-Morgan 法则因其对氨基葡萄糖的特异显色特性，常被应用于单糖组成为氨基葡萄糖的糖类化合物的含量检测中[16,22–24]。因此，在构建针对糖类植物免疫诱抗剂的比色分析方法之前，准确了解有效成分的单糖组成等信息显得尤为重要。

本研究重在探讨硫酸-苯酚法、硫酸-蒽酮法和 Elson-Morgan 法在不同糖类化合物的定量检测中的适用性。由于糖类植物免疫诱抗剂有效成分标准物质难以获得，本研究以葡聚糖、氨基寡糖素和多聚半乳糖醛酸分别作为单糖组成为葡萄糖、氨基葡萄糖和半乳糖醛酸 3 类糖类植物免疫诱抗剂有效成分的代表聚糖化合物，深入研究了这 3 种聚糖的特征显色反应机制及其影响因素。此外，本研究还验证了上述方法在市场上的糖类植物免疫诱抗剂制剂含量检测中的适用性，并就不同产品含量分析的比色法选择与开发进行了深入探讨。

1　实验部分

1.1　主要仪器和试剂

UV-1800PC 紫外-可见分光光度计 (配 M. Wave Professional 2.0 软件，上海美谱达仪器有限公司)；BP211D 分析天平 (上海天普分析仪器有限公司)；AL204 分析天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司)；HH-2B 数显恒温水浴锅 (常州荣华仪器制造有限公司)；SCI-VS 涡旋振荡器 (北京开源国创科技有限公司)。

92% 葡聚糖 (MW 3500，阿达玛斯试剂有限公司)；98% 多聚半乳糖醛酸 (上海皓鸿生物医药科技有限公司)；75% 氨基寡糖素 (母药，中国农业科学院植物保护研究所)。99.7% 葡萄糖 (中国计量科学研究院)；98.0% 半乳糖醛酸 (成都德思特生物技术有限公司)；99.0% 氨基葡萄糖盐酸盐 (上海甄准生物科技有限公司)。

99.5% 苯酚 (色谱纯，上海麦克林生化科技有限公司)；浓硫酸、浓盐酸、无水碳酸钠、氢氧化钠 (分析纯，国药集团化学试剂有限公司)；蒽酮 (分析纯，阿达玛斯试剂有限公司)；乙酰丙酮、对二甲氨基苯甲醛 (分析纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司)；无水乙醇 (分析纯，天津市致远化学试剂有限公司)；纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

市售 0.5% 香菇多糖水剂，2% 香菇多糖可溶液剂；6% 低聚糖素水剂（企业 A，制剂 1)，6% 低聚糖素水剂（企业 B，制剂 2），4% 低聚

糖素可溶粉剂（制剂 3）；0.5% 几丁聚糖可湿性粉剂，0.2% 几丁聚糖悬浮剂。

1.2　试剂配制方法

1.2.1　标准溶液的配制　分别称取含 0.025 g (精确至 0.000 01 g) 葡萄糖、半乳糖醛酸或氨基葡萄糖的标准品至 25 mL 容量瓶中，用纯净水溶解并定容，配制成 1000 mg/L 标准溶液，于 4 ℃ 保存，备用。

1.2.2　样品溶液的配制　葡聚糖样品溶液：称取含 0.05 g (精确至 0.000 01 g) 葡聚糖于 100 mL 容量瓶中，用纯净水溶解并定容至刻度，配制成 500 mg/L 葡聚糖溶液。随后用移液管取 2.0 mL 转移至 10 mL 容量瓶中，用纯净水定容至刻度，配制成 100 mg/L 葡聚糖样品溶液。

多聚半乳糖醛酸样品溶液：称取 0.10 g (精确至 0.000 01 g) 多聚半乳糖醛酸于烧杯中，于 60 ℃ 水浴中用适量纯净水搅拌 1 h 以促进溶解，冷却至室温后转移至 100 mL 容量瓶，用纯净水定容至刻度，配制成 1000 mg/L 多聚半乳糖醛酸溶液。随后用移液管取 1.0 mL 转移至 10 mL 容量瓶中，用纯净水定容至刻度，配制成 100 mg/L 多聚半乳糖醛酸样品溶液。

氨基寡糖素样品溶液：称取 0.02 g (精确至 0.000 01 g) 氨基寡糖素于 100 mL 容量瓶中，用纯净水溶解并定容至刻度，配制成 200 mg/L 氨基寡糖素样品溶液。

1.2.3　其他溶液的配制　80% 苯酚溶液：称取 8.0 g 苯酚，用纯净水溶解定容至 10 mL，存于棕色瓶，4 ℃ 保存。

5% 苯酚溶液：用纯净水将 80% 苯酚溶液稀释 16 倍，现配现用。

蒽酮试剂：称取 0.16 g 蒽酮溶于 100 mL 浓硫酸中，现配现用。

1 mol/L 碳酸钠溶液：称取 10.6 g 碳酸钠，用纯净水定容至 100 mL。

乙酰丙酮溶液：量取 3.5 mL 乙酰丙酮溶于 1 mol/L 碳酸钠溶液中，定容至 50 mL，现用现配，避光保存。

对二甲氨基苯甲醛溶液：称取 0.80 g 对二甲氨基苯甲醛溶于 15 mL 浓盐酸中，完全溶解后加入 15 mL 无水乙醇混合摇匀，现用现配，避光保存。

1.3　比色法测定步骤

1.3.1　硫酸-苯酚法　用移液管吸取 1.0 mL 待测溶液，加入 1.0 mL 5% 苯酚及 5.0 mL 硫酸，混匀后于 100 ℃ 水浴中反应 20 min，冷却至室温，于 490 nm 处测吸光度，通过校正曲线按公式 (1) 计算产品中聚糖含量。

$$\omega = \frac{c \times V \times M}{m \times M_1 \times 1000} \times N \times K \quad (1)$$

式中：ω 为样品中聚糖质量分数，%；c 为测得样品吸光度所对应单糖标准溶液的质量浓度，mg/L；V 为试样的体积，mL; m 为样品质量，g；M_1 为单糖标准品分子质量，葡萄糖 180.16 g/mol，半乳糖醛酸 194.16 g/mol，氨基葡萄糖 179.17 g/mol；M 为聚合单元的分子质量，葡聚糖 ($C_6H_{10}O_5$) 162 g/mol，多聚半乳糖醛酸 ($C_6H_8O_6$) 176.14 g/mol，氨基寡糖素 ($C_6H_{11}O_4N$) 161.16 g/mol；N 为稀释倍数；K 为校正系数。

1.3.2　硫酸-蒽酮法　用移液管吸取 2.0 mL 待测溶液，于冰浴状态下加入 3.0 mL 1.6 g/L 蒽酮试剂，在 100 ℃ 水浴中反应 8 min，冷却至室温，于 625 nm 处测吸光度，通过校正曲线按公式 (1) 计算产品中聚糖含量。

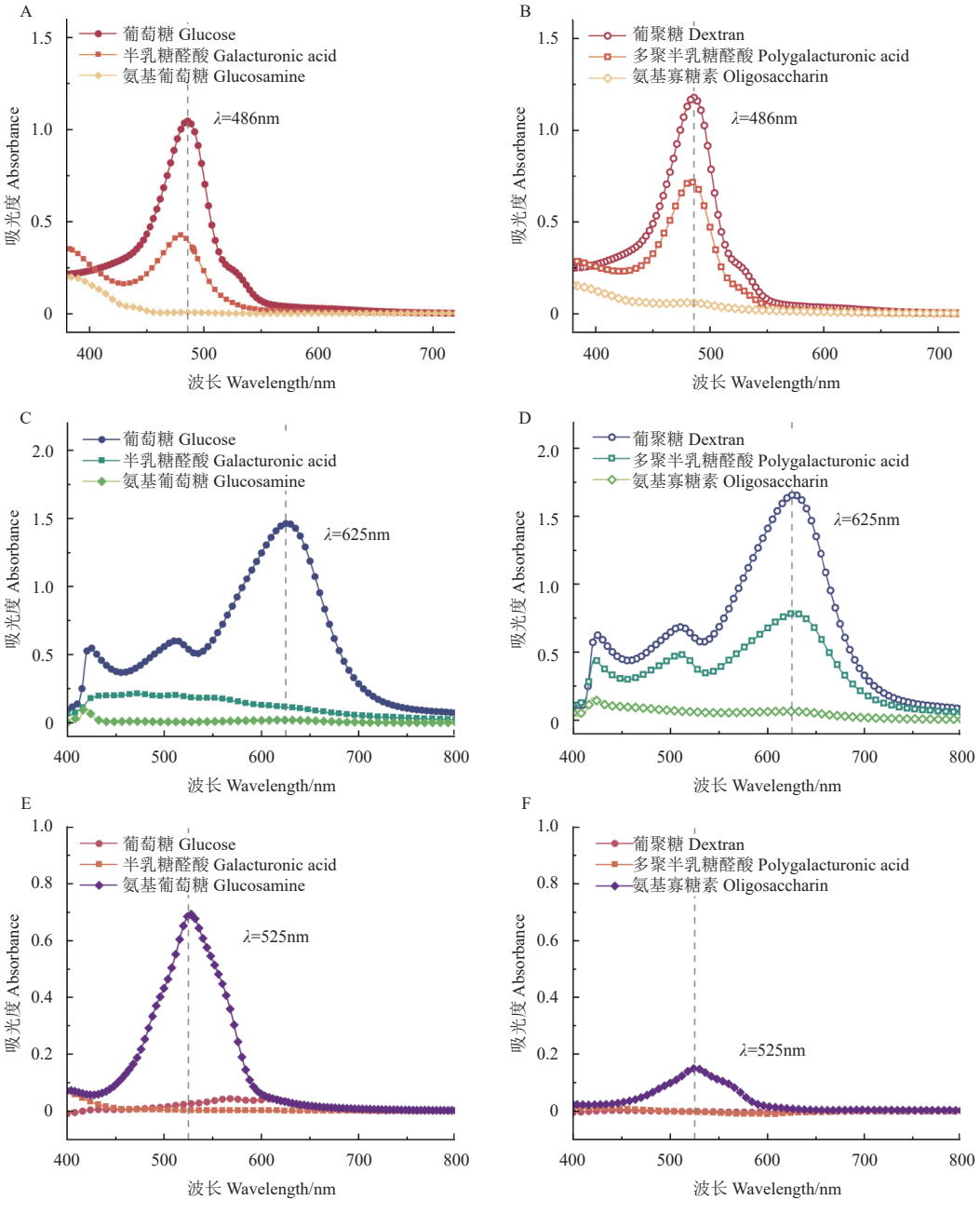
1.3.3　Elson-Morgan 法　水解步骤：聚糖溶液需经水解后进行显色反应。用移液管吸取 2.0 mL 聚糖样品溶液于 25 mL 螺旋塞玻璃试管中，加入 5.0 mL 浓盐酸，于 100 ℃ 油浴中搅拌 4 h。冷却后转移至蒸发皿中，于 70 ℃ 烘干。用水复溶并再次烘干，重复两次。用纯净水溶解并转移至容量瓶中，定容至 25 mL 待测。单糖标准溶液无需进行该步骤。

显色步骤：用移液管吸取 2.0 mL 聚糖水解液或单糖标准溶液，加入 1.0 mL 乙酰丙酮溶液，于沸水浴中反应 30 min，对氨基葡萄糖进行乙酰化。随后加入 2.0 mL 无水乙醇和 1.0 mL 对二甲氨基苯甲醛溶液，于 60 ℃ 恒温 1 h，自然冷却后于 525 nm 处测吸光度，通过校正曲线按公式 (1) 计算产品中的聚糖含量。

2　结果与讨论

2.1　三种比色方法对不同单糖和聚糖的显色反应

2.1.1　三种比色法对不同单糖和聚糖的特异性显色反应　糖类化合物的单糖组成是选择比色法的关键因素。在硫酸-苯酚法显色条件下，3 种单糖 (葡萄糖、半乳糖醛酸和氨基葡萄糖) 的显色光谱和吸光度随浓度变化的关系分别如图 1A、图 2A



A、B. 硫酸-苯酚法 (100 mg/L)；C、D：硫酸-蒽酮法 (100 mg/L)；E、F: 单糖 (16 mg/L) 和聚糖 (200 mg/L) 的 Elson-Morgan 法。

A, B. Sulfuric acid-phenol method (100 mg/L); C, D. Sulfuric acid-anthrone method (100 mg/L); E, F. Elson-Morgan method for detection of monosaccharides (16 mg/L) and polysaccharides (200 mg/L).

图 1 不同单糖和聚糖在 3 种比色法显色后的可见光谱

Fig. 1 Visible spectra of a variety of monosaccharides and polysaccharides using three different colorimetric methods

所示，其中葡萄糖、半乳糖醛酸呈现出相似的显色反应 (λ = 486 nm，呈橙黄色)，且吸光度随浓度呈现出明显的正相关。进一步与多糖显色光谱 (图 1B) 比较，葡聚糖和多聚半乳糖醛酸均具有相似的显色反应。在硫酸-苯酚法中，聚糖可以经浓硫酸水解成单糖，然后单糖再生成糠醛，最终糠醛与苯酚在浓硫酸和加热条件下反应生成橙黄色物质[25]。研究显示，该方法对葡萄糖和半乳糖醛酸及相应单糖组成的聚糖化合物产生相似的特征颜色反应，可用于以上糖类化合物的含量检测。值得注意的是，由于硫酸-苯酚法能对葡萄糖和半乳糖醛酸同时显色且显色程度不同，该方法用于单糖组成同时包含葡萄糖和半乳糖醛酸的杂多糖的检测时，测定结果与真实值可能出现一定偏差，此时应通过测定或计算校正因子进行校正[26]。

在硫酸-蒽酮法显色条件下，3 种单糖的显色

光谱和吸光度随浓度变化的关系分别如图 1C、图 2B 所示，可见仅有葡萄糖在该比色法条件下呈现特征颜色反应 (λ = 625 nm，呈蓝绿色)，吸光度随浓度呈现出明显的正相关。参考多糖显色光谱 (图 1D) 发现，葡聚糖的显色光谱和葡萄糖一致，而多聚半乳糖醛酸和半乳糖醛酸存在明显的差异。硫酸-蒽酮法的显色原理和硫酸-苯酚法类似，聚糖在浓硫酸催化下水解成单糖，随后单糖在强酸环境中转化为糠醛化合物，并进一步与蒽酮生成具有蓝绿色特征的产物[27]。研究显示，该方法对葡萄糖和葡聚糖产生相似的特征颜色反应，可用于葡聚糖的含量检测。

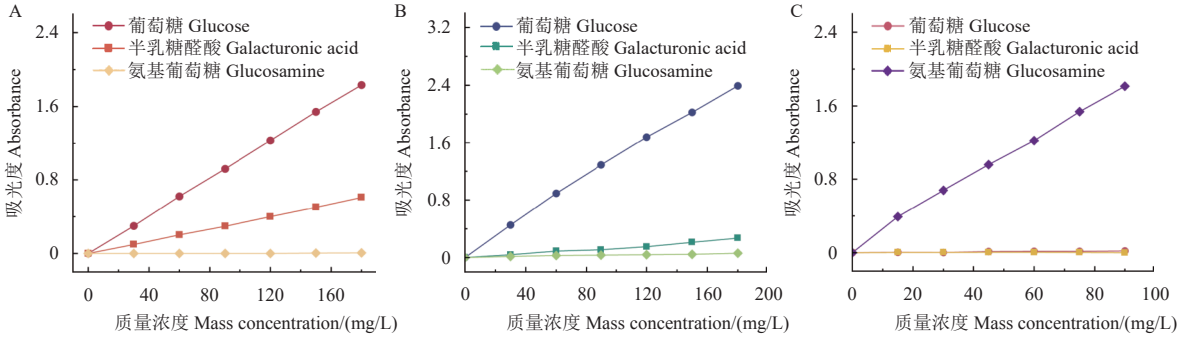
在 Elson-Morgan 法显色条件下，3 种单糖的显色光谱和吸光度随浓度变化的关系分别如图 1E、图 2C 所示，可见仅有氨基葡萄糖在该比色法条件下呈现特征颜色反应 (λ = 525 nm，呈紫红色)，吸光度随浓度呈现出明显的正相关。在 Elson-Morgan 法中，糖分子中的氨基与乙酰丙酮在高温、碱性条件下发生乙酰化反应，随后与对二甲氨基苯甲醛在酸性条件下发生显色反应。该反应初期呈现玫红色，经过保温稳定后生成紫色产物[24,28]。鉴于氨基是显色反应的关键基团，在测定该类多糖含量时，首要步骤是在酸性条件下对多糖进行水解，再进行显色反应。图 1F 清晰展示了 3 种多糖在盐酸环境中水解后，其水解液经显色反应所得的扫描光谱图，可见氨基寡糖素和氨基葡萄糖呈现相同的显色反应。因此，Elson-Morgan 法可用于氨基葡萄糖含量测定，而氨基寡糖素经过水解后也可以该方法进行含量测定。

2.1.2　校正系数的使用　值得注意的是，在硫酸-蒽酮法中 (如图 1C 和图 1D 所示)，半乳糖醛酸与多聚半乳糖醛酸表现出显著的显色光谱差异，此现象可能是由于多聚半乳糖醛酸结构中除半乳糖醛酸外还包含其他中性糖单元[29]。此特性在硫酸-苯酚法的应用中，同样引发了聚糖含量计算的偏差。为解决该问题，部分文献提出了通过引入校正系数的方法实现对复杂多糖含量的准确测定[26]。硫酸-苯酚法中，利用半乳糖醛酸标准品对已知含量的多聚半乳糖醛酸进行测定，引入校正系数 0.60，以消除方法本身存在的系统误差。Elson-Morgan 法中，利用氨基葡萄糖标准品测定已知含量的氨基寡糖素时，引入校正系数 1.7，该系数与行业标准 NY/T 2889—2016 一致[10]。

校正系数的确定与聚糖化合物的单糖组成紧密相关。其依据主要包括两方面：一是不同单糖在相同显色体系下吸光度的差异性，导致对单糖组成差异显著的聚糖化合物进行定量时，校正系数可能存在一定差异，需进一步研究才能确定。二是聚糖化合物水解为单糖过程中可能发生的损失。这可能与水解条件有关，因此需要对水解反应和比色反应条件进行优化并严格控制。

2.2　硫酸-苯酚法和硫酸-蒽酮法的影响因素

糖类化合物定量测定过程中显色反应条件的控制对含量的准确测定尤为重要[16]。本研究在 1.3.1 节硫酸-苯酚法的基础上，设置了浓硫酸的体积 (3、4、5、6、7 mL)、苯酚质量分数 (3%、4%、5%、6%、7%) 和加热时间 (15、20、40、60、80 min) 3 个变量，以探究这些显色反应条件对吸光度的影响，结果如图 3A~C 所示。最终确定葡聚糖和多聚半乳糖醛酸的最佳硫酸-苯酚法显色操作

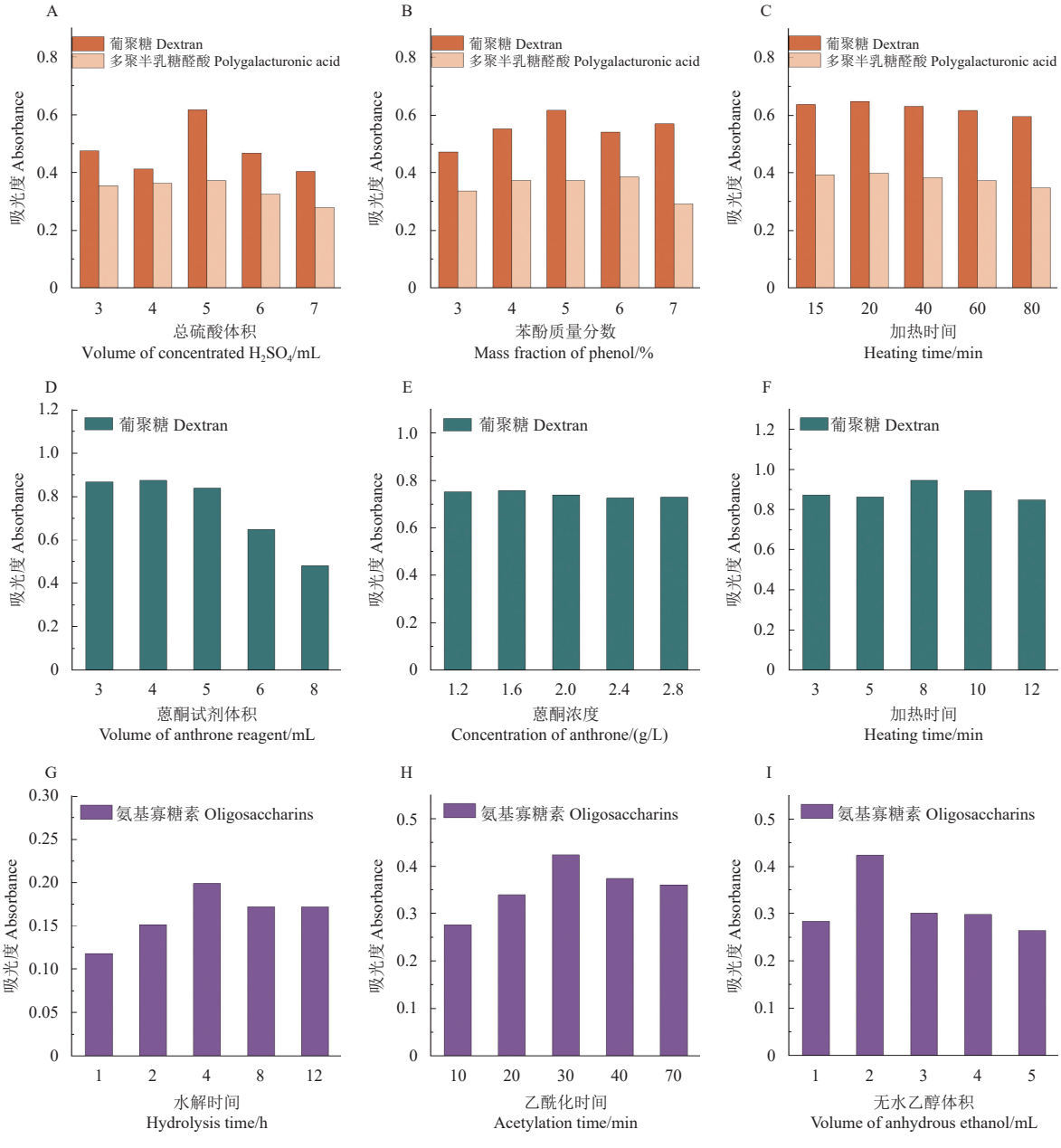


A．硫酸-苯酚法；B. 硫酸-蒽酮法；C. Elson-Morgan 法。

A. Sulfuric acid-phenol method; B. Sulfuric acid-anthrone method; C. Elson-Morgan method.

图 2　不同单糖和聚糖在 3 种比色法显色后吸光度与质量浓度的关系

Fig. 2　Relationship between absorbance and concentration of different monosaccharides and polysaccharides using three colorimetric methods



A~C：硫酸-苯酚法；D~F：硫酸-蒽酮法；G~I：Elson-Morgan 法。

A-C: Sulfuric acid-phenol method; D-F: Sulfuric acid-anthrone method; G-I: Elson-Morgan method.

图 3 葡聚糖、多聚半乳糖醛酸和氨基寡糖素测定中显色反应的影响因素

Fig. 3 Factors influencing the colorimetric methods in the determination of dextran, polygalacturonic acid and oligosaccharins

条件为：浓硫酸体积 5 mL、苯酚质量分数为 5%、加热 20 min 为最适显色反应条件。

在 1.3.2 节硫酸-蒽酮法的基础上，设置了蒽酮试剂体积 (3、4、5、6、7 mL)、蒽酮试剂质量浓度 (1.2、1.6、2.0、2.4、2.8 g/L) 和加热时间 (3、5、8、10、12 min) 3 个变量对吸光度的影响，结果如图 3D~F 所示。蒽酮试剂的加入量对显色反应的影响较大，增加蒽酮试剂体积会导致葡聚糖的吸光度明显下降。这可能是由于过量蒽酮试剂使糖类物质发生了炭化所致。此外，葡聚糖的吸光度随着蒽酮试剂质量浓度和加热时间的增加呈先增加后降低的趋势。综上，确定葡聚糖的硫酸-蒽酮法最优显色条件为：3 mL 1.6 g/L 蒽酮试剂、沸水浴加热 8 min。

2.3 Elson-Morgan 法的影响因素

Elson-Morgan 法与硫酸-苯酚法和硫酸-蒽酮法有所不同，该方法在进行聚糖含量测定时需要先将聚糖水解为单糖，常用的水解方法是加热酸水

解。本研究首先设定 2 mL 样品溶液中加入 5 mL 浓盐酸，研究不同水解时间对氨基寡糖素水解并显色后吸光度的影响。结果 (图 3G) 显示：水解时间 4 h 能使氨基寡糖素的显色程度达到最高水平。此外，还探讨了乙酰化过程的保温时间和加入无水乙醇的体积对显色反应的影响，结果如图 3H~I 所示。发现当乙酰化时间至少为 30 min，并加入 2 mL 无水乙醇时，为显色反应的最优条件。

需要注意的是，乙酰化过程需要碱性反应条件，故聚糖水解液需要通过挥发或中和等方式去除水解反应剩余的酸后，方能进行乙酰化过程[28]。此外，无水乙醇的加入量会影响显色反应体系中水/乙醇的比例，对显色反应的程度也有较大影响[24,30]。根据以上研究和分析，确定氨基寡糖素的最优检测条件为：浓盐酸水解 4 小时，乙酰化反应保温 30 min，再加入 2 mL 无水乙醇和 1 mL 对二甲氨基苯甲醛溶液进行显色反应。

2.4　比色法测定三种聚糖含量的方法验证

2.4.1　线性关系　葡聚糖的含量测定以葡萄糖为标准物质，采用硫酸-苯酚法时标准溶液质量浓度分别为 30、45、60、75 和 90 mg/L，采用硫酸-蒽酮法时分别为 15、30、45、60 和 75 mg/L。多聚半乳糖醛酸的含量测定以半乳糖醛酸为标准物质，采用硫酸-苯酚法时，标准溶液质量浓度分别为 60、90、120、150 和 180 mg/L。氨基寡糖素的含量测定以氨基葡萄糖为标准物质，采用 Elson-Morgan 法时标准溶液质量浓度分别为 10、20、30、40 和 50 mg/L。分别测定以上单糖标准溶液的吸光度 (y)，以单糖标准溶液的浓度 (x) 为横坐标绘制标准曲线。从表 1 可知，在相应的浓度范围内，3 种单糖吸光度与质量浓度间均表现出良好的线性相关性，决定系数 (R^2) 均在 0.998 以上。且吸光度范围在 0.193~1.061 之间，有利于减少测量误差并提高分析的灵敏度。

2.4.2　精密度　本研究以葡聚糖、多聚半乳糖醛酸和氨基寡糖素开展了相应方法的精密度实验，参照 1.2 节配制样品溶液，重复 5 次，按 1.3 节中相应比色法进行吸光度测定。通过 1.3.1 节中公式计算三种聚糖的有效成分含量，结果汇总见表 2。

精密度测试结果显示，不同方法测得的葡聚糖、多聚半乳糖醛酸和氨基寡糖素质量分数测定结果的相对标准偏差 (relative standard deviation，RSD) 均较小，证明方法重复性好，符合产品质量分析方法要求。

2.4.3　准确度　不同方法的准确度实验采用标准添加法：硫酸-苯酚法的准确度试液以葡聚糖 (或多聚半乳糖醛酸) 溶液和 50 mg/L 的葡萄糖 (或 190 mg/L 的半乳糖醛酸) 标准溶液各 0.5 mL 配制。硫酸-蒽酮法的准确度试液以葡聚糖溶液和 60 mg/L 的葡萄糖标准溶液各 1 mL 配制。Elson-Morgan 法的准确度试液以氨基寡糖素溶液和 18 mg/L 的氨基葡萄糖标准溶液各 1 mL 配制。所有准确度测试液配制均重复 5 次，按 1.3 节相应比色法进行吸光度测定。结果 (表 2) 显示：不同方法的回收率均在 100%~101% 之间，RSD < 1.1%，方法准确度符合要求。

基于上述讨论与分析，本研究确立了用于测定葡聚糖 (硫酸-苯酚法、硫酸-蒽酮法)、多聚半乳糖醛酸 (硫酸-苯酚法) 和氨基寡糖素 (Elson-Morgan 法) 含量的比色法。

2.5　糖类免疫诱抗剂含量比色分析法的探讨

2.5.1　市售低聚糖素制剂有效成分的鉴别　当前市场上多种低聚糖素制剂产品的有效成分界定尚不明晰，权威信息匮乏。国家标准 GB 4839—2009 已界定氨基寡糖素、几丁聚糖和葡聚糖的有效成分，但其他产品的精准阐述仍属空白[31]。在企业标准中，部分产品的有效成分仍存在争议。例如，香菇多糖的产品有效成分是否包含蛋白质

表 1　葡萄糖、半乳糖醛酸和氨基葡萄糖在对应比色法中的线性关系

Table 1　Linearity of glucose, galacturonic acid and glucosamine in corresponding colorimetric methods

方法 Method	标准品 Standard	回归方程 Regression equation	线性范围 Linear range/(mg/L)	吸光度范围 Absorbance range	决定系数 R^2
硫酸-苯酚法 Sulfuric acid-phenol method	葡萄糖 Glucose	$y = 1.06x - 0.017$	30~90	0.303~0.943	1.00
	半乳糖醛酸 Galacturonic acid	$y = 0.68x - 0.006$	60~180	0.296~0.699	1.00
硫酸-蒽酮法 Sulfuric acid-anthrone method	葡萄糖 Glucose	$y = 0.68x - 0.013$	15~75	0.193~1.013	1.00
Elson-Morgan 法 Elson-Morgan method	氨基葡萄糖 Glucosamine	$y = 1.02x + 0.059$	10~50	0.600~1.061	0.998

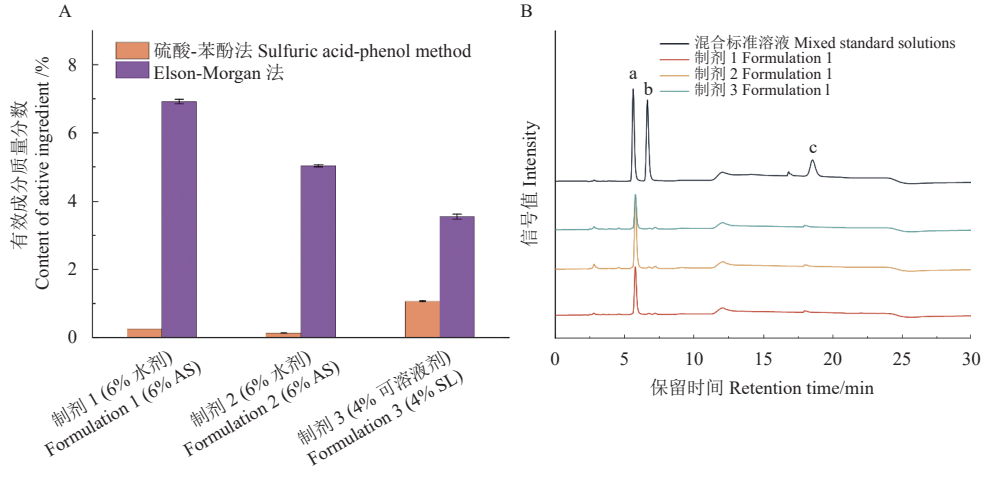
表 2 葡聚糖、多聚半乳糖醛酸和氨基寡糖素在对应比色法中的精密度和准确度

Table 2 Precision and accuracy of dextran, polygalacturonic acid and oligosaccharins using the corresponding colorimetric methods

样品 Sample	方法 Method	精密度 Precision		准确度 Accuracy	
		平均含量 Average content/%	RSD/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD/%
葡聚糖 Dextran	硫酸-苯酚法 Sulfuric acid-phenol method	92.0	0.9	101	0.8
	硫酸-蒽酮法 Sulfuric acid-anthrone method	92.4	0.4	100	1.1
多聚半乳糖醛酸 Polygalacturonic acid	硫酸-苯酚法 Sulfuric acid-phenol method	98.8	0.4	101	0.5
氨基寡糖素 Oligosaccharins	Elson-Morgan 法 Elson-Morgan method	75.9	0.8	100	1.0

片段部分；低聚糖素存在寡聚半乳糖醛酸和低聚氨基葡萄糖两种不同有效成分的产品。

本研究根据建立的硫酸-苯酚法与 Elson-Morgan 法，对市售 3 种低聚糖素制剂进行了检测。从图 4A 可以看出，3 种产品的有效成分以氨基葡萄糖聚合物为主，而其企业标准中列出的寡聚半乳糖醛酸成分几乎可忽略不计。此外，本研究参照 NY/T 2889—2016 中的水解条件，采用离子色谱法进一步分析了这 3 种低聚糖素制剂的单糖组成[10]。结果 (图 4B) 显示，在盐酸水解液中，仅检测到氨基葡萄糖的特征峰，进一步证实市售低聚糖素产品有效成分的单糖组成主要为氨基葡萄糖，而非半乳糖醛酸。这也说明市售低聚糖素制剂主要有效成分的鉴别还不准确。



A. 硫酸-苯酚法和 Elson-Morgan 法定量分析结果对比；B. 产品水解液的离子色谱图 (a. 氨基葡萄糖；b. 葡萄糖；c. 半乳糖醛酸)。

A. Comparison of quantitative analytical results between the sulfuric acid-phenol method and the Elson-Morgan method; B. Ion chromatograms of the product hydrolysate (a. Glucosamine; b. Glucose; c. Galacturonic acid).

图 4 市售 3 种低聚糖素制剂有效成分定性和定量鉴定结果

Fig. 4 Qualitative and quantitative results of the active ingredients of three oligosaccharin formulations from the market

2.5.2 部分糖类植物免疫诱抗剂制剂含量的比色分析方法的方法验证 本研究在既定方法体系的基础上，针对香菇多糖、低聚糖素及几丁聚糖产品进行了方法验证。鉴于糖类植物免疫诱抗剂种类繁多，且各有效成分间的理化性质存在较大差异，因此在制备不同有效成分的样品时，操作过程有所不同。具体而言，香菇多糖的测定采用了醇沉-水提法进行样品溶液的制备：样品先经无水乙醇沉淀处理，然后以 80% 乙醇洗涤，最后在沸水浴条件下利用蒸馏水进行提取。该方法能够在一定程度上减少样品中单糖对测定结果的干扰。低聚糖素则可 Elson-Morgan 法的水解和稀释步骤；而几丁聚糖的样品应直接经盐酸水解，并通过挥发去除剩余盐酸后进行显色反应。

方法验证的结果如表 3 所示。在针对市售制剂的有效成分含量进行检测时，单糖标准溶液在

表 3　市售香菇多糖、低聚糖素和几丁聚糖制剂的有效成分含量通用检测方法的验证

Table 3　Validation of a universal assay for the active ingredient content of marketed shiitake mushroom polysaccharide, oligosaccharides and chitosan formulations

待检产品 Pesticide	方法 Method	线性关系 Linear relationship		精密度 Precision		准确度 Accuracy	
		范围 Linear range/(mg/L)	R^2	平均含量 Average content/%	RSD/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD/%
0.5% 香菇多糖水剂 0.5% Fungous proteoglycan AS	硫酸-苯酚法 Sulfuric acid-phenol method	5~90	0.999	0.44	1.5	97	1.1
2% 香菇多糖可溶液剂 2% Fungous proteoglycan SL				1.91	0.7	98	0.9
6% 低聚糖素水剂 6% Oligosaccharide AS	Elson-Morgan 法 Elson-Morgan method	4~64	0.999	6.91	0.8	98	1.5
4% 低聚糖素可溶粉剂 4% Oligosaccharide SP				3.56	1.9	97	1.7
0.5% 几丁聚糖可湿性粉剂 0.5% Chitosan WP	Elson-Morgan 法 Elson-Morgan method	0~100	0.995	0.47	2.3	99	2.1
0.2% 几丁聚糖悬浮剂 0.2% Chitosan SC				0.19	2.1	100	1.0

相应浓度范围内呈良好的线性关系，且精密度与平均添加回收率均达到了产品质量检测方法所规定的要求[32]。

2.5.3　比色分析法的局限性与糖类植物免疫诱抗剂的管理建议　比色法作为一种经济实惠、设备要求相对较低的检测技术，在糖类化合物分析领域，尤其适用于糖类植物免疫诱抗剂有效成分的批量检测。但从产品的定性角度来看，该技术尚存在一定的局限性。必要时可结合其他手段进行辅助定性。例如，若制剂中添加单糖可能会干扰比色法的测定结果，影响检测的有效性。针对制剂中可能存在的非目标糖类的潜在干扰，可采用如色谱法等具有更高特异性的分析方法进行辅助确证。

另一方面，针对制剂中可能存在非目标糖的干扰问题，监管体系应进一步完善其规范和控制措施。对于氨基寡糖素水剂，NY/T 2889.2—2016 中已对制剂中的单糖含量做出了明确规定 (≤0.1%)，但目前尚未发现其他糖类植物免疫诱抗剂中关于单糖组分含量的明确规范和控制要求[11]。此外，本文建议加强对产品组分和有效成分关键信息的系统化规范与控制，如单糖组成、分子质量分布、糖苷键类型等信息，以期进一步准确监管产品的有效性和质量稳定性。

3　结论和展望

本文系统研究了硫酸-蒽酮法、硫酸-苯酚法及 Elson-Morgan 法对多种糖类化合物的适用性和比色反应的影响因素，并探索了针对不同糖类植物免疫诱抗剂有效成分含量测定的比色分析方法的构建策略。

结果表明，糖类化合物的单糖组成是选择适宜比色法的关键。硫酸-苯酚法适用于含葡萄糖或半乳糖醛酸为单糖组成的糖类含量测定，但需注意两者间的潜在干扰；硫酸-蒽酮法适用于葡萄糖为单糖组成的糖类含量测定；而 Elson-Morgan 法对以氨基葡萄糖为单糖组成的糖类含量测定展现出良好适用性。这为不同糖类化合物的比色法选择提供了清晰的指导。

以葡聚糖、多聚半乳糖醛酸和氨基寡糖素为代表聚糖化合物，对比色反应的影响因素进行了探讨。结果表明，对比色反应影响较大的因素包括：硫酸苯酚法中的总硫量和苯酚质量分数、硫酸-蒽酮法中的蒽酮试剂总量以及 Elson-Morgan 法中的水解时间、乙酰化时间和无水乙醇体积等因素。在此基础上确立了适用于 3 类聚糖的比色法检测条件。经验证，这 3 种比色法在其线性范围内均呈现出优异的线性相关性，精密度 (RSD) 较小，表明方法精密度高、稳定性良好；平均加标回收率稳定在 100~101% 之间，方法的准确度高。

应用上述方法结合离子色谱法对市售低聚糖素制剂进行定性分析，发现其主要有效成分为氨基葡萄糖聚合物，而寡聚半乳糖醛酸含量极低，这一发现与部分企业的产品标识不符。此外，本研究还验证了硫酸-苯酚法在香菇多糖检测、Elson-Morgan 法在低聚糖素及几丁聚糖制剂检测中的有效性，方法均呈现出良好的线性、重现性和准确度，满足质量控制需求，为制剂有效成分含量检测提供了可靠的方法支持。通过对 3 种比色法局限性和糖类植物免疫诱抗剂的管理策略进行分析，本文提出应进一步优化和完善糖类

植物免疫诱抗剂产品监管体系，加强对产品组分和有效成分关键信息的系统化规范和控制，以期实现产品的有效性和质量稳定性的精准监管。

这一研究有望为我国糖类生物农药含量检测方法的开发提供方法支持，为糖类植物免疫诱抗剂的产品质量监管体系的构建提供建议，进而推动我国糖类植物免疫诱抗剂产业的稳步发展。

参考文献 (References):

[1] 邱德文. 我国植物免疫诱导技术的研究现状与趋势分析[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 10-14.
QIU D W. Research status and trend analysis of plant immune induction technology in China[J]. Plant Prot, 2016, 42(5): 10-14.

[2] ZHU F, CAO M Y, ZHANG Q P, et al. Join the green team: inducers of plant immunity in the plant disease sustainable control toolbox[J]. J Adv Res, 2024, 57(5): 15-42.

[3] 陈学新, 杜永均, 黄健华, 等. 我国作物病虫害生物防治研究与应用最新进展[J]. 植物保护, 2023, 49(5): 340-370.
CHEN X X, DU Y J, HUANG J H, et al. Recent progresses in biological control of crop pathogens and insect pests in China[J]. Plant Prot, 2023, 49(5): 340-370.

[4] 吴宇炼, 范慧艳, 汪彦欣, 等. 植物免疫诱抗剂研究文献计量可视化分析[J]. 中国农学通报, 2022, 38(27): 138-146.
WU Y L, FAN H Y, WANG Y X, et al. Bibliometrics visualization analysis of plant immune inducers[J]. Chin Agric Sci Bull, 2022, 38(27): 138-146.

[5] JIA X C, ZENG H H, BOSE S K, et al. Chitosan oligosaccharide induces resistance to *Pst* DC3000 in *Arabidopsis* via a non-canonical N-glycosylation regulation pattern[J]. Carbohydr Polym, 2020, 250: 116939.

[6] YANG C, LIU R, PANG J H, et al. Poaceae-specific cell wall-derived oligosaccharides activate plant immunity via OsCERK1 during *Magnaporthe oryzae* infection in rice[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2178.

[7] WANG Q, LONG Y, AI Q, et al. Oligosaccharins used together with tebuconazole enhances resistance of kiwifruit against soft rot disease and improves its yield and quality[J]. Horticulturae, 2022, 8(7): 624.

[8] CHEN G, SHANGGUAN W J, CHEN H P, et al. Chitooligosaccharide modified pesticide-loaded polyurethane microcapsules to mitigate drought stress in wheat[J]. Chem Eng J, 2024, 479: 147688.

[9] 张宏军, 陶岭梅, 刘学, 等. 我国生物农药登记管理情况分析[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 9-17.
ZHANG H J, TAO L M, LIU X, et al. Review on registration and management of bio-pesticide in China[J]. Chin J Biol Contr, 2022, 38(1): 9-17.

[10] 氨基寡糖素 第 1 部分: 氨基寡糖素母药: NY/T 2889.1—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
Oligochitosan Part 1: Oligochitosan technical concentrates (TK): NY/T 2889.1—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.

[11] 氨基寡糖素 第 2 部分: 氨基寡糖素水剂: NY/T 2889.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
Oligochitosan Part 2: Oligochitosan aqueous solution (AS): NY/T 2889.2—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.

[12] 刘艳霞. 分光光度计法检测氨基寡糖素水剂的方法探讨[J]. 山东化工, 2016, 45(11): 89-91.
LIU Y X. Study on the measurement of amino-oligosaccharin agent by UV spectrophotometry[J]. Shandong Chem Ind, 2016, 45(11): 89-91.

[13] 邱丹, 闫永君. 分光光度法分析生物农药 0.5% 香菇多糖水剂[J]. 化学工程师, 2010, 24(7): 25-26.
QIU D, YAN Y J. Analysis of 0.5% lentinan agent biological pesticides by spectrophotometry[J]. Chem Eng, 2010, 24(7): 25-26.

[14] ZHAO C, WU Y J, LIU X Y, et al. Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides[J]. Trends Food Sci Technol, 2017, 66: 135-145.

[15] 赵春霞, 余河水, 王春华, 等. 中药中糖类定性及定量研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2184-2192.
ZHAO C X, YU H S, WANG C H, et al. Progress in qualitative and quantitative research of sugars in traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(9): 2184-2192.

[16] 李计萍. 中药新药研究中多糖含量测定方法探讨[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3392-3394.
LI J P. Discussion on polysaccharide determination methods in new Chinese drug research[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(17): 3392-3394.

[17] 赵秀婷, 张欣, 付萌, 等. 基于微波水解-离子色谱的香菇多糖组成指纹图谱研究[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(3): 70-77.
ZHAO X T, ZHANG X, FU M, et al. Research on fingerprint of lentinan composition by microwave hydrolysis-ion chromatography [J]. Sci Technol Cereals Oils Foods, 2021, 29(3): 70-77.

[18] 孙盼盼, 王静, 曹际云. 高效液相色谱-紫外检测分析木槿花多糖水解单糖组分[J]. 食品工业, 2024, 45(2): 306-309.
SUN P P, WANG J, CAO J Y. Analysis of hydrolyzed monosaccharide components of Hibiscus polysaccharide by HPLC-UV detection[J]. Food Ind, 2024, 45(2): 306-309.

[19] 吴玉超, 陈意苹. HPLC-ELSD 法检测农药中氨基寡糖素含量的研究[J]. 广东化工, 2022, 49(13): 178-180.
WU Y C, CHEN Y P. Determination of amino oligosaccharide in pesticide by HPLC-ELSD[J]. Guangdong Chem Ind, 2022, 49(13): 178-180.

[20] 杨跃辉, 姜清华, 丁平田. 植物中多糖分析方法的研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1239-1242.
YANG Y H, JIANG Q H, DING P T. Advances in studies on analytical methods of polysaccharides in plant[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2011, 42(6): 1239-1242.

[21] MANTOVANI V, GALEOTTI F, MACCARI F, et al. Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides[J]. Electrophoresis, 2018, 39(1): 179-189.

[22] 李亚平, 周鸿立. 多糖中糖醛酸含量测定方法的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(17): 207-211.
LI Y P, ZHOU H L. Progress on determination content of uronic acid in polysaccharides[J]. Food Res Dev, 2019, 40(17): 207-211.

[23] ZHANG W H, WU J, WENG L Y, et al. An improved phenol-sulfuric acid method for the determination of carbohydrates in the presence of persulfate[J]. Carbohydr Polym, 2020, 227: 115332.

[24] Morgan W T J, Elson L A, 陈祥娥. 比色法测定 *N*-乙酰葡糖胺和 *N*-乙酰半乳糖胺[J]. 食品与药品, 2010, 12(9): 374-378.
Morgan W T J, A E, CHEN X E. Determination of *N*-

acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine by colorimetry[J]. Food Drug, 2010, 12(9): 374-378.

[25] 张青, 张天民. 苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技, 2004, 6(7): 17-18.
ZHANG Q, ZHANG T M. Determination of polysaccharide content by phenol-sulfuric acid colorimetry[J]. Shandong Food Drug, 2004, 6(7): 17-18.

[26] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550-553.
DONG Q, ZHENG L Y, FANG J N. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo and polysaccharides[J]. Chin Pharm J, 1996, 31(9): 550-553.

[27] 朱伟. 蒽酮-硫酸比色法测定香菇多糖含量[J]. 北方药学, 2011, 8(8): 8-9.
ZHU W. Determination of the lentinan content by anthrone-sulfuric acid colorimetry[J]. J N Pharm, 2011, 8(8): 8-9.

[28] Benjamin Schloss, 陈祥娥. 比色法测定葡糖胺[J]. 食品与药品, 2011, 13(11): 451-455.
SCHLOSS B, CHEN X E. Colorimetric determination of glucosamine[J]. Food Drug, 2011, 13(11): 451-455.

[29] MATSUURA Y, MATSUBARA K, FUCHIGAMI M. Molecular composition of onion pectic acid[J]. J Food Sci, 2000, 65(7): 1160-1163.

[30] 葛许恒. 应用正交试验改进埃尔逊-摩根反应的条件[J]. 中国药事, 1998, 12(1): 51-53.
GE X H. Improving conditions for Elson-Morgan reaction by orthogonal test[J]. Chin Pharm Aff, 1998, 12(1): 51-53.

[31] 农药中文通用名称: GB 4839—2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
Chinese common name for pesticides: GB 4839—2009[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009.

[32] 农药产品质量分析方法确认指南: NY/T 2887—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
Guidelines on validation of analytical methods for agrochemicals: NY/T 2887—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.

(责任编辑: 陈雅洁)