·论著·一次研究·

蓝莓叶超高效液相指纹图谱的建立及5个指标性成分含量测定

刘明珍[1]，孙照翠[1]，王　亮[2]，金　磊[2]，杨雯婕[2]，陈冬杰[2]，杨曙方[2]，马国需[1]，许旭东[1]

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室（北京 100193）
2. 浙江蓝美技术股份有限公司（浙江诸暨 311800）

【摘要】目的 建立基于超高效液相色谱（UPLC）技术对不同来源蓝莓叶的指纹图谱分析以及同时测定5个主要化学成分含量的方法，为其质量评价提供依据。**方法** 采用UPLC法建立针对11个不同来源蓝莓叶的UPLC指纹图谱，测定各样品中绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的含量，并借助相似度评价、聚类分析探讨样品之间化学信息差异。**结果** 11个不同来源样品的指纹图谱共标定6个共有峰，各样品指纹图谱相似度在0.635～0.969之间；聚类分析可将样品分为三大类；绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷在不同来源蓝莓叶中的含量分别为ND（未检出）～36 321.09 μg/g、205.66～2 938.07 μg/g、381.96～5 584.52 μg/g、478.19～4 494.98 μg/g、148.14～643.84 μg/g。**结论** 本研究建立的蓝莓叶UPLC指纹图谱和多成分含量测定方法简便易行，准确可靠，为今后构建蓝莓叶质量控制体系提供参考。

【关键词】蓝莓叶；超高效液相色谱法；UPLC指纹图谱；绿原酸
【中图分类号】R927.2　　**【文献标识码】**A

Establishment of UPLC fingerprint and simultaneous determination of five indicator components in blueberry leaves

LIU Mingzhen[1], SUN Zhaocui[1], WANG Liang[2], JIN Lei[2], YANG Wenjie[2], CHEN Dongjie[2], YANG Shufang[2], MA Guoxu[1], XU Xudong[1]

1. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
2. Zhejiang Lanmei Technology Co., Ltd., Zhuji 311800, Zhejiang Province, China
Corresponding authors: MA Guoxu, Email: mgxfl8785@163.com; XU Xudong, Email: xudu2012@163.com

【Abstract】Objective To establish an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint method and simultaneously determine 5 major chemical components for blueberry leaves from different origins, and provide a basis for its quality evaluation. **Methods** The chemical fingerprints of blueberry leaves from 11 different origins were established by UPLC. The contents of chlorogenic acid, hyperoside, rutin, isoquercitrin and astragalin in each sample were determined.

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202605077
基金项目：浙江省“高层次人才特殊支持计划”科技创业领军人才项目（2022R53009）；云南省社会发展专项（202403AC100006）
通信作者：马国需，博士，研究员，博士研究生导师，Email：mgxfl8785@163.com
许旭东，博士，研究员，博士研究生导师，Email：xudu2012@163.com

Similarity evaluation and cluster analysis were combined to compare the chemical differences among samples. **Results** A total of 6 common peaks were identified in the fingerprints of samples from the 11 origins, with fingerprint similarities ranging from 0.635 to 0.969. Cluster analysis classified the samples into three major groups. The contents of chlorogenic acid, hyperoside, rutin, isoquercitrin and astragalin in blueberry leaves from different origins were ND(not detected)-36,321.09 μg/g, 205.66-2,938.07 μg/g, 381.96-5,584.52 μg/g 478.19-4, 494.98 μg/g, and 148.14-643.84 μg/g, respectively. **Conclusion** The UPLC fingerprint and multi-index constituents determination methods established in this study are simple, feasible, accurate and reliable, providing a reference for the future development of a quality control system for blueberry leaves.

【Keywords】Blueberry leaves; UPLC; UPLC fingerprint; Chlorogenic acid

蓝莓（*Vaccinium* Spp.）为杜鹃花科（*Ericaceae*）越桔属（*Vaccinium*）低灌木植物，其栽培品种包括高丛蓝莓（*Vaccinium. corymbosum* L.）和兔眼蓝莓（*Vaccinium. virgatum* Aiton）等，其果实富含花青素、多酚等活性成分，深受消费者喜爱，已形成涵盖鲜果销售、加工制品及保健品的成熟产业链[1-2]。然而随着蓝莓消费量的持续增长和全球种植面积的不断扩大，蓝莓种植及加工过程中产生的废弃蓝莓叶数量也显著增加，资源浪费问题日益突出。近年来的研究证实，蓝莓叶同样富含黄酮类、酚酸类、萜类等多种次级代谢产物，具有抗氧化、抗炎、抗菌、降血糖、降血脂等药理活性，在医药、保健品、化妆品等领域有广阔开发前景[3]。比如，黄酮类化合物可清除自由基、减少细胞氧化损伤，起到延缓衰老和预防慢性病的作用；酚酸类成分有抗炎抗菌能力，可用于开发天然抗菌剂和抗炎药物[4-7]。我国蓝莓栽培面积居世界前列，蓝莓叶资源量巨大，系统开发其药用与功能食品价值，既是变废为宝的资源循环路径，也是产业提质增效的必然选择。然而当前蓝莓叶质量评价体系严重滞后，系统性质量标准的缺失已制约其标准化开发进程。

蓝莓叶所含化学成分虽已得到一定程度的阐明，但不同品种、产地间的差异极大：日本兔眼蓝莓叶以低聚原花青素及咖啡酰奎宁酸、黄酮苷、儿茶素为主；欧洲野生越橘叶主要含绿原酸和槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸；加拿大矮丛蓝莓叶则以绿原酸含量最为丰富[8]。这种由遗传背景与产地环境共同决定的化学差异，使建立统一的质量标准面临较大困难。现有研究多集中于蓝莓叶的成分鉴定、提取工艺与药理活性报道[9]，专门面向蓝莓叶的液相指纹图谱与可指导生产的定量质量标准十分有限。相比之下，蓝莓品质的液相色谱质量控制研究已形成清晰脉络：早期以单一成分定量为主，随后发展为“鉴别 + 定量”一体化的HPLC指纹图谱法[10-11]，并逐步纳入品种差异[12]和特定产区规范化表征[13]。但上述成果多集中于果实及花色苷提取物，专门面向蓝莓叶的液相指纹图谱与多指标定量标准研究仍尚未建立，成为制约蓝莓叶标准化、产业化开发的关键瓶颈。

基于此，本研究拟建立11批不同来源蓝莓叶的超高效液相色谱（ultra-performance liquid chromatography，UPLC）指纹图谱[14]，并测定其中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷成分含量[15-16]，通过指纹图谱相似度评价与含量测定，揭示不同来源样品间的质量差异和化学特征，为蓝莓叶质量控制、资源评价及合理开发利用提供科学依据，进而支撑相关产品质量提升与蓝莓产业的可持续发展。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

ACQUITY UPLC I-Class 液相仪配 TUV 检测器、Xevo G2-XS Q TOF 超高效液相色谱-四级杆质谱联用仪购自美国沃特世公司；Quintix612 万分之一电子天平（德国赛多利斯公司）；MS105 十万分之一电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）。

1.2 主要药品与试剂

金丝桃苷对照品（成都克洛玛生物科技有限公司，批号：PU1234-0100mg，纯度 ≥ 98%）；紫云英苷对照品（瑞士 Fluka Chemie AG 公司，批号：68437，纯度 ≥ 98%）；异槲皮苷对照品（成都普思生物科技有限公司，批号：PS0400-0200mg，纯度 ≥ 98%）；咖啡酸对照品（上海麦

克林生化科技有限公司，批号：C804977，纯度≥98%）；芦丁对照品（美国药典委员会，批号：1606503，纯度≥98%）；绿原酸对照品（美国Sigma-Aldrich，批号：SLBF3987V，纯度≥95%）；甲醇和乙腈为色谱纯；甲酸为质谱级；水为超纯水。

本试验所用蓝莓叶材料共涉及5个商业栽培品种，分别为“蓝美1号”“密斯提”“莱格西”“奥尼尔”及“灿烂”。其中‘灿烂’为兔眼蓝莓（*Vaccinium. virgatum* Aiton）类型，其余4个品种为高丛蓝莓（*Vaccinium. corymbosum* L.）类型。所有样品均于夏季采收自人工露天种植的3年生以上植株。蓝莓叶来源信息见表1。

表1 蓝莓叶来源信息

Table 1. Source information of blueberry leaves

编号	品种	产地	原植物类型
S1	蓝美1号	安徽安庆	高丛蓝莓
S5	密斯提	安徽安庆	高丛蓝莓
S7	莱格西	安徽安庆	高丛蓝莓
S8	奥尼尔	安徽安庆	高丛蓝莓
S4	蓝美1号	浙江诸暨	高丛蓝莓
S6	密斯提	浙江诸暨	高丛蓝莓
S9	奥尼尔	浙江诸暨	高丛蓝莓
S11	灿烂	浙江诸暨	兔眼蓝莓
S3	蓝美1号	四川通江	高丛蓝莓
S10	灿烂	四川通江	兔眼蓝莓
S2	蓝美1号	江西抚州	高丛蓝莓

2 方法与结果

2.1 样品的采集与制备

采集无损伤新鲜蓝莓叶，超纯水冲洗后吸干表面水分，平铺于阴凉通风处自然晾晒3~5 d（避免阳光直射），定期翻动，至叶片脆折，含水量≤8%即为完成干燥。干燥后的蓝莓叶先粗粉碎，再细粉碎，用60目筛网过筛，未通过者再次粉碎，所得粉末装袋标识，置于干燥器中保存。

2.2 供试品溶液的制备

取蓝莓叶粉末约1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入70%乙醇10 mL，称定质量，60 ℃加热2 h，放冷，再次称定质量，用70%乙醇补足损失的质量，摇匀滤过，取续滤液，用70%乙醇稀释4倍，即得。

2.3 对照品溶液的制备

取绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷对照品适量，精密称定，加50%甲醇溶解，配制成每1 mL分别含2 000、140、236、168、120 μg的溶液，即得。

2.4 蓝莓叶指纹图谱建立

2.4.1 分析条件

UPLC色谱条件：色谱柱：ACQUITY UPLC® BEH C_{18}柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1%甲酸溶液（B），梯度洗脱（0~5 min，95% B；5~8 min，95%→94% B；8~9 min，94% B；9~13 min，94%→90% B；13~15 min，90% B；15 min~16 min，90%→89% B；16~19 min，89%→88% B；19~24 min，88% B；24~25 min，88%→87% B；25~28 min，87%→86% B；28~30 min，86% B）；流速：0.3 mL/min；柱温：30 ℃；检测波长：360 nm；进样量：5 μL。

质谱（mass spectrometry，MS）条件：电喷雾离子源；采用负离子模式采集；采集方式为双碰撞能量交替扫描（MSE）；脱溶剂温度为450 ℃；脱溶剂气流量为600 L/h；雾化气压力为6.0 Bar；毛细管电压为2.4 kV；锥孔电压为40 V；碰撞能量为15~45 eV；质量扫描范围为*m/z* 100~1 500。

2.4.2 蓝莓叶组成分析

在检测波长360 nm条件下，通过UPLC-MS联用法对其进行分析。图1-A为蓝莓叶样品的UPLC色谱图，图1-B为对照品的UPLC色谱图，图2为蓝莓叶样品的总离子流图，图3为1~6号色谱峰的一级MS与二级MS信息。经与对照品保留时间及质谱碎片信息比对，确认1~6号峰分别为绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷，鉴定结果见表2。值得注意的是，1号峰与2号峰在UPLC色谱与MS中的出峰顺序存在不一致现象，这可能是因为绿原酸与咖啡酸虽同属酚酸类化合物，但其分子结构、电离特性以及在C_{18}色谱柱上的保留行为均存在差异，故在UPLC与MS检测中呈现不同的响应顺序。

2.4.3 精密度试验

取蓝莓叶粉末（编号：S1）适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.4.1”项下分析条件连续进样6次。以5号峰作为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间的*RSD* < 0.10%，相对峰面积的*RSD* < 0.87%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验

取同一蓝莓叶粉末（编号：S1）6份，分别

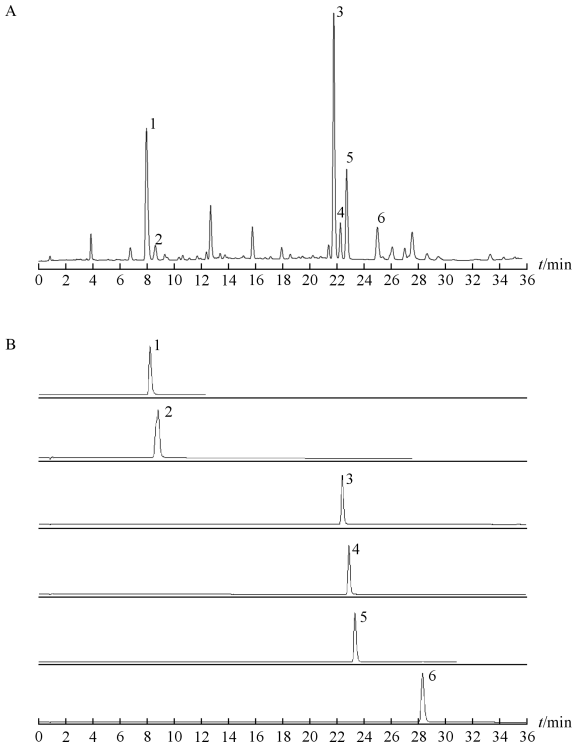

图1 UPLC色谱图

Figure 1. UPLC chromatogram

注：A.供试品溶液（编号：S1）；B.对照品溶液；1.绿原酸；2.咖啡酸；3.金丝桃苷；4.芦丁；5.异槲皮苷；6.紫云英苷。

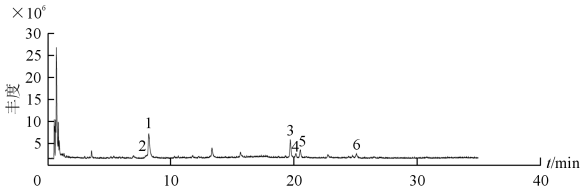

图2 蓝莓叶样品总离子流图

Figure 2. Total ion chromatogram of blueberry leaf sample

注：1.绿原酸；2.咖啡酸；3.金丝桃苷；4.芦丁；5.异槲皮苷；6.紫云英苷。

按“2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.4.1”项下分析条件进样测定。以5号峰作为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间的*RSD* < 0.10%，相对峰面积的*RSD* < 1.28%（*n*=6），表明方法重复性符合要求。

2.4.5 稳定性试验

取同一供试品溶液（编号：S1），于室温条件下分别放置0、2、4、8、12、24 h后按“2.4.1”项下分析条件进样测定。以5号峰作为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间的*RSD* < 0.12%，相对峰面积的*RSD* < 1.29%（*n* = 6），表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

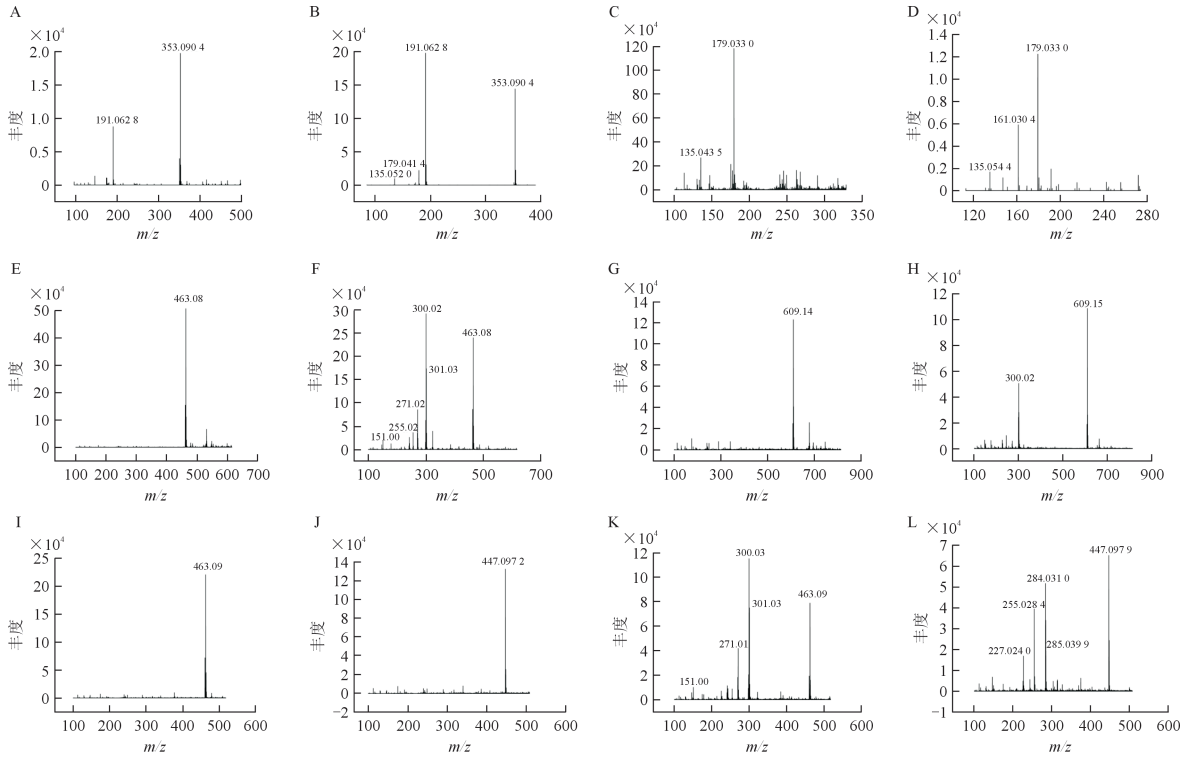

图3 1~6号峰的一级和二级MS图

Figure 3. Primary and secondary mass spectra of peaks 1−6

注：A和B.峰1对应的一、二级MS图；C和D.2号峰对应的一、二级MS图；E和F.峰3对应的一、二级MS图；G和H.峰4对应的一、二级MS图；I和J.峰5对应的一、二级MS图；K和L.峰6对应的一、二级MS图。

表2 蓝莓叶化学成分鉴定结果

Table 2. Identification results of chemical components in blueberry leaves

峰号	保留时间（min）	化合物	分子式	加和离子	质荷比（*m/z*）		误差（×10^{-6}）	碎片离子
					测量值	理论值		
1	8.38	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	[M−H]$^-$	353.090 4	353.087 3	8.78	191.062 8，179.041 4，135.052 0
2	8.34	咖啡酸	$C_9H_8O_4$	[M−H]$^-$	179.033 0	179.035 0	−11.17	161.030 4，135.054 4
3	19.73	金丝桃苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	[M−H]$^-$	463.086 3	463.087 7	−3.02	301.032 7，300.024 6，271.025 8，255.028 5，151.007 1
4	20.18	芦丁	$C_{27}H_{30}O_{16}$	[M−H]$^-$	609.146 3	609.145 6	1.15	300.026 9，301.035 6
5	20.53	异槲皮苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	[M−H]$^-$	463.090 6	463.087 7	6.26	300.031 6，301.034 5，271.011 9，242.022 2，151.005 6
6	25.11	紫云英苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[M−H]$^-$	447.097 2	447.093 3	8.72	285.039 9，284.031 0，255.028 4，227.024 0

2.4.6 指纹图谱的建立

取11批蓝莓叶样品，精密称定，分别按“2.1”和“2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定，记录11批蓝莓叶色谱图（图4）。11批蓝莓叶样品各共有峰保留时间的*RSD*均小于5%，符合UPLC指纹图谱技术要求，可作为指纹图谱特征峰；各共有峰峰面积的*RSD*均大于54%，表明样品共有特征组分的出峰行为一致性良好，但化学成分的含量水平存在较大差异，且无明显规律。

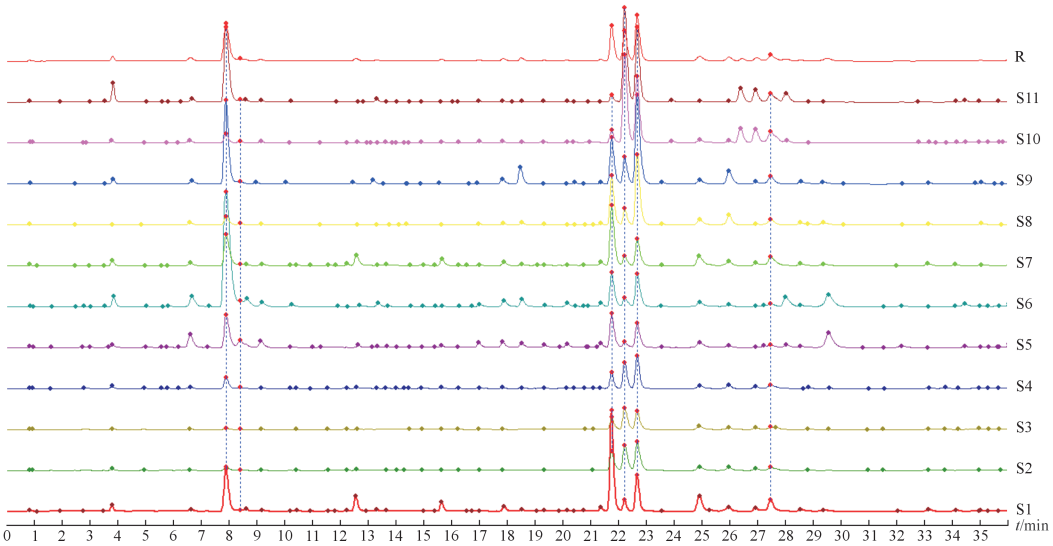

图4 11批蓝莓叶样品的UPLC叠加指纹图谱

Figure 4. Overlaid UPLC fingerprint chromatograms of 11 batches of blueberry leaves samples

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012年版）[14]对11批蓝莓叶的UPLC图谱进行处理。以S1图谱为参照，运用中位数法生成对照图谱（R），时间窗宽度设为0.1 min，经多点校正后进行Mark峰匹配，获得样品的叠加指纹图谱与共有模式图谱。共有峰筛选原则为信噪比 > 3，相对峰面积 > 0.1%，分离度 > 1.5，共有峰占比（共有峰面积/总色谱峰面积 × 100%）在37.07% ~ 68.57%之间。结果显示，不同来源的11批蓝莓叶样品共确定了6个共有峰，经与对照品比对，1号峰为绿原酸，2号峰为咖啡酸，3号峰为金丝桃苷，4号峰为芦丁，5号峰为异槲皮苷，6号峰为紫云英苷。

2.4.7 蓝莓叶UPLC指纹图谱相似度分析

以中位数法计算11批样品与对照指纹图谱的相似度，相似度评价结果见表3。样品与对照品图谱相似度在0.731 ~ 0.959之间，其中样品S9相似度最高（0.959），样品S5、S4、S11均大于0.9，与对照图谱一致性较好；样品S10相似度最低（0.731），样品S6、S3相似度也相对偏低，图谱轮廓与对照存在一定偏离。不同批次样品图谱间的相似度结果表明，蓝美1号在江西抚州、四川通江、浙江诸暨产地样品组内相似度高，化学模式相近；而安徽安庆产蓝美1号则与同产地莱格西样品高度相似。同一品种在不同产地图谱差异

表3 11批蓝莓叶指纹图谱相似度评价结果

Table 3. Similarity evaluation results of fingerprints of 11 batches of blueberry leaves

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	R
S1	1.000	0.660	0.589	0.664	0.910	0.629	0.993	0.760	0.751	0.396	0.510	0.822
S2	0.660	1.000	0.989	0.982	0.657	0.325	0.695	0.893	0.691	0.927	0.792	0.840
S3	0.589	0.989	1.000	0.962	0.579	0.267	0.621	0.823	0.620	0.955	0.794	0.792
S4	0.664	0.982	0.962	1.000	0.727	0.466	0.715	0.887	0.797	0.926	0.878	0.907
S5	0.910	0.657	0.579	0.727	1.000	0.830	0.936	0.752	0.922	0.454	0.694	0.924
S6	0.629	0.325	0.267	0.466	0.830	1.000	0.680	0.364	0.875	0.253	0.701	0.781
S7	0.993	0.695	0.621	0.715	0.936	0.680	1.000	0.783	0.810	0.455	0.586	0.872
S8	0.760	0.893	0.823	0.887	0.752	0.364	0.783	1.000	0.753	0.689	0.611	0.820
S9	0.751	0.691	0.620	0.797	0.922	0.875	0.810	0.753	1.000	0.575	0.845	0.959
S10	0.396	0.927	0.955	0.926	0.454	0.253	0.455	0.689	0.575	1.000	0.853	0.731
S11	0.510	0.792	0.794	0.878	0.694	0.701	0.586	0.611	0.845	0.853	1.000	0.895
R	0.822	0.840	0.792	0.907	0.924	0.781	0.872	0.820	0.959	0.731	0.895	1.000

显著，密斯提、灿烂、奥尼尔均表现出明显产地分化；安徽安庆产地表现出较强环境效应，可使不同品种样品化学轮廓趋同。浙江诸暨产地奥尼尔（编号：S9）与对照图谱相似度最高，四川通江产地灿烂（编号：S10）与对照图谱相似度最低。上述结果表明，蓝莓叶液相指纹图谱特征是品种遗传特性与产地环境共同调控的结果。

2.4.8 聚类分析

将不同来源蓝莓叶样品（编号：S1 ~ S11）的6个共有峰峰面积数据进行Z-score标准化处理后，导入SPSS 27.0.1软件进行聚类分析。采用组间连接，以欧氏距离为度量标准，结合谱系图分支特征，并兼顾样品品种与产地的实际背景信息，当欧氏距离为20时，11批样品被分为3类（图5）：第一类为S1 ~ S4、S7 ~ S9，包含全部蓝美1号及部分莱格西、奥尼尔，其中蓝美1号跨4个产地聚为一类，显示品种遗传主导其含量特征；同产地安庆的莱格西、奥尼尔归入本组，说明产地可弱化品种间差异；第二类为S10、S11（灿烂），跨产地聚为单一类别，品种特异性强；第三类为S5、S6（密斯提），虽聚为一类但聚合距离较大，提示品种特征明显但产地仍造成内部差异。综上，蓝莓叶共有峰含量受品种遗传基础与产地环境共同调控，品种遗传是蓝莓叶共有峰含量特征的主要决定因素。

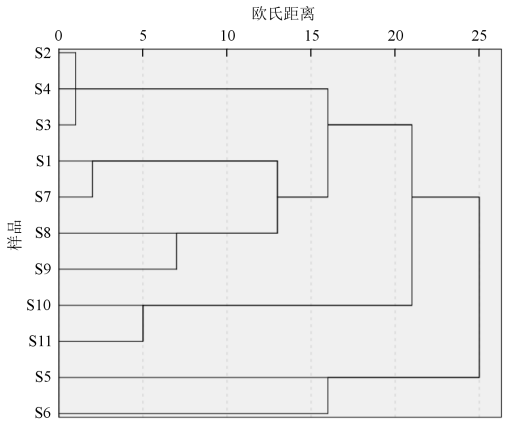

图5 11批蓝莓叶样品的聚类分析图

Figure 5. Dendrogram of fingerprint cluster analysis of 11 batches of blueberry leaves

2.5 含量测定

2.5.1 色谱条件

同“2.4.1”项下UPLC色谱条件。

2.5.2 线性关系、检测限及定量限考察

配制混合对照品溶液，逐级稀释，过0.22 μm滤膜，按“2.4.1”项下UPLC色谱条件进样测定，以对照品绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的浓度为横坐标（*X*，μg/mL）、峰面积为纵坐标（*Y*）绘制标准曲线，并计算回归方程和相关系数*r*，结果见表4。取5种对照品，用50%甲醇溶解，稀释，按“2.4.1”项下UPLC色谱条件进样测定，分别以信噪比3∶1和10∶1时的质量浓度作为检测限和定量限，结果见表4。

2.5.3 精密度试验

精密量取“2.5.2”项下的混合对照品溶液进行适当稀释，按“2.4.1”项下UPLC色谱条件连续进样6次，计算得绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷峰面积的*RSD*分别为1.24%、

表4 线性关系、检测限及定量限考察结果

Table 4. Results of the linear relationship test, detection limit and quantification limit investigation

成分	线性方程	r	线性范围（μg/mL）	检测限（μg/mL）	定量限（μg/mL）
绿原酸	$Y = 4\,384X - 977$	0.999 9	12.50 ~ 2 000.00	6.29	12.50
金丝桃苷	$Y = 614\,66X - 58\,517$	0.999 5	2.18 ~ 140.00	1.09	2.18
芦丁	$Y = 33\,303X - 55\,987$	0.999 5	3.68 ~ 236.00	1.84	3.68
异槲皮苷	$Y = 43\,016X - 66\,568$	0.999 2	2.62 ~ 168.00	1.31	2.62
紫云英苷	$Y = 56\,807X - 42\,129$	0.999 6	1.87 ~ 120.00	0.94	1.87

0.56%、0.56%、0.56%、1.42%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验

取同一蓝莓叶粉末（编号：S1）6份，分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.4.1”项下UPLC色谱条件进样测定，计算得绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的平均含量分别为9.15、2.95、0.63、1.59、0.64 mg/g，*RSD*分别为1.24%、0.56%、0.56%、0.56%、1.42%（$n = 6$），表明方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验

取同一供试品溶液（编号：S1），于室温条件下分别放置0、2、4、8、12、24 h后按“2.4.1”项下UPLC色谱条件进样测定，计算得绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷峰面积的*RSD*分别为0.83%、0.47%、0.66%、0.62%、2.13%（$n = 6$），表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验

精密称取蓝莓叶粉末（编号：S1）0.5 g，分别按样品中各指标成分含有量的80%、100%、120%精密加入对照品粉末，每个浓度平行3份，按“2.2”项下方法分别制备供试品溶液，再按“2.4.1”项下UPLC色谱条件进样测定，按照绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的含量分别为9.15、2.95、0.63、1.59、0.64 mg/g，计算得绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的平均回收率为92.85%、95.96%、108.8%、103.4%、93.43%，*RSD*分别为1.15%、3.38%、1.46%、2.33%、4.50%（$n = 9$），表明该方法准确性良好。

2.5.7 样品的含量测定

精密称取11批蓝莓叶粉末，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.4.1”项下UPLC色谱条件进样测定，代入线性方程计算样品中绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的含量，结果见表5。

表5 样品含量测定结果（μg/g，$n = 4$）

Table 5. Results of content determination of samples（μg/g, n =4）

编号	绿原酸	金丝桃苷	芦丁	异槲皮苷	紫云英苷
S1	9 267.53	2 958.07	623.81	1 606.87	642.00
S2	679.13	679.09	1765.09	1 575.74	245.50
S3	未检出	205.66	618.22	478.19	148.14
S4	2 023.24	502.10	1 532.90	1 561.76	247.82
S5	7 268.28	1 110.32	381.96	1 256.32	202.55
S6	36 321.09	1 195.64	672.19	1 833.65	604.81
S7	7 225.66	2 027.40	601.79	1 434.83	643.84
S8	1 770.08	1 661.24	1 038.51	3 800.92	344.73
S9	22 212.81	1 445.80	1 573.68	4 494.98	420.10
S10	1 264.45	337.65	4 501.23	2 591.11	581.15
S11	15 625.12	236.57	5 584.52	3 470.49	512.09

3 讨论

本研究考察了色谱柱、流动相及检测波长等条件，建立了不同来源蓝莓叶的UPLC指纹图谱及5种酚酸和黄酮类成分（绿原酸、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷）的含量测定方法。方法采用ACQUITY UPLC® BEH C_{18}色谱柱（100 mm × 2.1 mm，1.7 μm），以乙腈–0.1%甲酸水梯度洗脱，5种目标成分分离良好（分离度均大于1.5）；检测波长经200 ~ 400 nm UV扫描后确定为360 nm，可兼顾酚酸与黄酮类成分的响应。该方法分析时间较短，可同时实现指纹图谱采集与多成分定量，方法学验证结果符合要求，可为蓝莓叶的质量控制提供可靠手段。

指纹图谱相似度分析显示，11批样品的相似度在0.731 ~ 0.959之间，说明不同来源蓝莓叶均具有统一的共有化学成分基础，但化学轮廓存在明显的分化趋势。为进一步揭示样品间的分类规

律，对所有批次样品进行系统聚类分析，能将11批样品划分为3大类。综合指纹图谱相似度与聚类分析，揭示蓝莓叶化学品质受品种遗传基础与产地环境共同影响，是“品种遗传基础主导、产地环境介导调控”的协同结果。含量测定结果显示，各成分积累差异较大：绿原酸波动最显著，紫云英苷相对稳定。绿原酸在多数样品中积累水平较高，样品S6、S9、S11均超过10 000 μg/g；芦丁和异槲皮苷在样品S10、S11中相对突出，说明代谢积累存在品种与产地偏向性。样品S3各成分整体偏低，次生代谢较弱；样品S6表现为绿原酸富集；样品S10、S11具有芦丁积累优势，反映了化学表型的多样性。从数据趋势看，四川通江样品多数指标性成分整体偏低，浙江诸暨样品绿原酸整体偏高（限本批样本表现）。

本研究建立的UPLC指纹图谱与多指标定量方法可有效区分不同来源蓝莓叶的化学差异，为其质量评价提供了初步方法参考。需要指出的是，受限于样本量及品种-产地组合未完全正交匹配，本研究结果仅为探索性分析，尚不足以严格界定品种或产地的独立效应。观察到的样品S3低值与样品S6高值差异，可能与品种特性、产地环境及次生代谢活性有关，但均为单批次结果，有待后续进一步验证。此外，本研究发现绿原酸富集型（如样品S6）和高芦丁型（如样品S10、S11）等特色样品，部分样品中绿原酸含量接近或优于杜仲叶、金银花等传统富含酚酸的植物原料，表明蓝莓叶具备功能成分开发的潜在价值，可为后续定向选育与资源筛选提供参考。与富含绿原酸和黄酮醇、侧重于广谱抗菌与降血糖等整体代谢调节的蓝莓叶提取物不同，“蓝美1号”蓝莓花色苷提取自蓝莓果实，完整保留了15种花色苷组分且总花色苷含量超过40%。该花色苷能够有效穿透血-视网膜屏障，在精准修复眼底微血管损伤及改善眼部微循环方面展现出更为突出的靶向保护优势。二者各具特色，共同拓宽了蓝莓全株资源在功能性产品开发中的应用前景[17]。综上，所建方法可为蓝莓叶资源筛选、质量标准建立及后续标准化应用提供参考依据。

参考文献

1 Wu Y, Han T, Yang H, et al. Known and potential health benefits and mechanisms of blueberry anthocyanins: a review[J]. Food Biosci, 2023, 55: 103050. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.103050.

2 Duan Y, Tarafdar A, Chaurasia D, et al. Blueberry fruit valorization and valuable constituents: a review[J]. Int J Food Microbiol, 2022, 381: 109890. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109890.

3 Turhan S, Temiz H, Koca AF. Oxidative stability of brined anchovies with extracts from blueberry(*Vaccinumsp.*) fruits and leaves[J]. J Food Qual, 2009, 32(4): 411-424. DOI: 10.1111/j.1745-4557.2009.00270.x.

4 Li YC, Li BX, Geng LJ. Hypolipidemic and antioxidant effects of total flavonoids from blueberry leaves[J]. Eur Food Res Technol, 2011, 233(6): 897-903. DOI: 10.1007/s00217-011-1572-z.

5 Wang J, Tian J, Li D, et al. Blueberry leaves as a promising sustainable source of polyphenols: chemical composition, functional activities and future application perspectives[J]. Food Res Int, 2025, 207: 116110. DOI: 10.1016/j.foodres.2025.116110.

6 Wang LJ, Wu J, Wang HX, et al. Composition of phenolic compounds and antioxidant activity in the leaves of blueberry cultivars[J]. J Funct Foods, 2015, 16: 295-304. DOI: 10.1016/j.jff.2015.04.027.

7 Hsin-Rong Y, Bing-Huei C. Analysis of phenolic acids and flavonoids in rabbiteye blueberry leaves by UPLC-MS/MS and preparation of nanoemulsions and extracts for improving antiaging effects in mice[J]. Foods, 2023, 12(10): 1942. DOI: 10.3390/foods12101942.

8 Ștefănescu R, Laczkó-Zöld E, Ősz BE, et al. An updated systematic review of vaccinium myrtillus leaves: phytochemistry and pharmacology[J]. Pharmaceutics, 2023, 15: 16. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010016.

9 齐健博, 吴喜民, 孙帅, 等. 蓝莓叶化学成分、药理作用及活性成分提取检测方法研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(12): 91-100. [Qi JB, Wu XM, Sun S, et al. Research progress on chemical composition, pharmacological effects and active ingredient extraction and determination methods of blueberry (*Vaccinium spp.*) leaves[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese, 2022, 56(12): 91-100.] DOI: 10.16305/j. 1007-1334.2022.2207055.

10 刘志刚, 刘晓燕, 杜超, 等. 蓝莓花色苷提取物HPLC指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 58-61. [Liu ZG, Liu XY, Du C, et al. Fingerprints analysis of blueberry anthocyanins extract by HPLC[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(21): 58-61.] DOI: 10.13422/j. cnki. syfjx.2015210058.

11 Liu B, Hu T, Yan W. Authentication of the bilberry extracts by an HPLC fingerprint method combining reference standard extracts[J]. Molecules, 2020, 25: 2514. DOI: 10.3390/molecules25112514.

12 刘彩芬, 秦公伟, 韩豪, 等. UPLC-MS/MS分析不同品种蓝莓中的花青苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 62-68. [Liu CF, Qin GW, Han H, et al. Analysis of anthocyanins in different blueberry cultivars by UPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2018, 24(21): 62-68.] DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20182191.

13 王小东. 大兴安岭地区蓝莓HPLC指纹图谱研究[J]. 科技创新导报, 2018, 15(20): 246-247. [Wang XD. HPLC fingerprint

study of blueberry from the greater khingan range[J]. Science and Technology Innovation Herald, 2018, 15(20): 246-247.] DOI: 10.16660/j.cnki.1674-098X.2018.20.246.

14 吴文静, 徐烨, 尚秧. 基于指纹图谱结合一测多评定量分析的蓝莓花青素提取物质量控制方法研究[J]. 当代化工, 2024, 53(2): 282-293. [Wu WJ, Xu Y, Shang Y. Quality control method of blueberry anthocyanin extract based on fingerprint combined with quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Contemporary Chemical Industry, 2024, 53(2): 282-293.] DOI: 10.13840/j.cnki.cn21-1457/tq.2024.02.012.

15 张盈娇, 陈建, 夏陈. 高效液相色谱法测定蓝莓叶中绿原酸的含量[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(3): 34-36. [Zhang YJ, Chen J, Xia C. Determination of chlorogenic acid in blueberry leaves by high performance liquid chromatography[J]. Food and Nutrition in China, 2017, 23(3): 34-36.] DOI: 10.3969/j. issn.1006-9577.2017.03.008.

16 李坤, 武瑞, 伊文君, 等. 杜仲叶中绿原酸含量测定方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(3): 61-63. [Li K, Wu R, Yi WJ, et al. Establishment of a method for the determination of chlorogenic acid in *Eucommia ulmoides* leaves[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2015, 51(3): 61-63.] DOI: 10.3969/j.issn.0529-6005.2015.03.021.

17 Liu YX, Liu GM, Cao MJ, et al. Potential retinal benefits of dietary polyphenols based on their permeability across the blood-retinal barrier[J]. J Agric Food Chem, 2017, 65 (15): 3179-3189. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00844.

收稿日期：2026 年 05 月 19 日 修回日期：2026 年 09 月 28 日
本文编辑：周璐敏 冼静怡