

HPLC-UV-FLD 与显微注射法筛选恭城油茶中的抗氧化成分

褚广翠¹, 刘文娟¹, 侯小涛², 程传景³, 郝二伟^{2*}, 侯媛媛^{3*}, 白 钢³, 邓家刚²

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 广西中医药大学 农作物废弃物功能成分研究协同创新中心, 广西 南宁 530200

3. 南开大学 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300353

摘要: **目的** 建立高效液相紫外荧光 (HPLC-UV-FLD) 衍生系统, 利用显微注射荧光探针技术对恭城油茶提取物中抗氧化活性成分进行初步评价。**方法** 采用过氧化氢急性损伤实验及羟自由基清除能力实验对恭城油茶的抗氧化活性进行检测, 利用 HPLC-UV-FLD 衍生系统对其中的抗氧化活性成分进行筛选, 并采用超高压液相色谱-四级杆-飞行时间质谱技术 (UPLC-Q/TOF-MS) 对收集得到的活性成分峰进行定性分析。同时通过显微注射过氧化氢荧光探针分子 (NBCD) 检测活体果蝇体内过氧化氢水平, 探究恭城油茶及其中筛选出的活性成分在体内清除过氧化氢的作用。**结果** 该方法方便快捷, 在恭城油茶提取物中筛选出了表没食子儿茶素 (EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 和表儿茶素没食子酸酯 (ECG) 3 种主要的抗氧化活性成分。同时检测出恭城油茶及其抗氧化活性成分能够显著降低果蝇体内过氧化氢水平。**结论** 为进一步研究恭城油茶抗氧化提供物质基础, 并且为天然产物中的抗氧化活性成分的筛选方法提供参考。

关键词: 恭城油茶; 抗氧化; HPLC-UV-FLD; UPLC-Q/TOF-MS; 显微注射; 表没食子儿茶素; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 表儿茶素没食子酸酯

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)11-2545-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.007

Screening of anti-oxidant components of Gongcheng Tea by HPLC-UV-FLD and micro-injection systems

CHU Guang-cui¹, LIU Wen-juan¹, HOU Xiao-tao², CHENG Chuan-jing³, HAO Er-wei², HOU Yuan-yuan³, BAI Gang³, DENG Jia-gang²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Collaborative Innovation Center of Research on Functional Ingredients from Agricultural Residues, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

3. State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300353, China

Abstract: Objective A high performance liquid chromatography-ultraviolet-fluorescence (HPLC-UV-FLD) derivative system was established and the anti-oxidant activity of the extract of Gongcheng Tea was preliminarily evaluated by using a micro-injector imaging system combined with a fluorescent probe. **Methods** Hydrogen peroxide assay and hydroxyl radical scavenging ability experiments were carried out on the anti-oxidant activity of Gongcheng Tea. The anti-oxidant components of Gongcheng Tea were screened by HPLC-UV-FLD post column derivation system and analyzed by an ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q/TOF MS). At the same time, the hydrogen peroxide scavenging activity of tea and active components were tested by a micro-injector imaging system combined with a hydrogen peroxide fluorescent probe (NBCD) in living *Drosophila melanogaster*. **Results** The method was simple and rapid, and three main anti-oxidant compounds, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, and epicatechin gallate were found in Gongcheng Tea. And it was found that they could significantly reduce the level of hydrogen peroxide in *D. melanogaster*. **Conclusion** It laid a material basis for the further study of the anti-oxidant activity of Gongcheng Tea, and provided a reference for the screening of anti-oxidants in natural products.

收稿日期: 2018-12-10

基金项目: 广西科技计划项目: 恭城油茶系列国际化健康产品开发研究 (桂科 AD17129010)

作者简介: 褚广翠, 女, 硕士, 研究方向为药物化学。E-mail: chuguangcui@163.com

*通信作者 侯媛媛, 女, 博士, 副教授, 主要从事复方药物与系统生物学研究。E-mail: houyy@nankai.edu.cn

郝二伟, 男, 博士, 副教授, 主要从事中药药效筛选及基础理论研究。E-mail: ewhao@163.com

Key words: Gongcheng Tea; anti-oxidant; HPLC-UV-FLD; UPLC-Q/TOF-MS; micro-injection; epigallocatechin gallate; epicatechin gallate

“恭城油茶”是恭城瑶族的一种传统食品，以老叶红茶为主料，据史料记载始于唐代，距今已有 1 000 多年的历史^[1-3]。2014 年，恭城被评为中国长寿之乡^[4]，长寿的秘诀跟包括油茶在内的饮食习惯应有莫大的关系。随着全球人口老龄化趋势的加剧，多种能够延长生命的方法被发现，例如饮食限制^[5]、激活长寿基因 sirtuin^[6]、延长端粒^[7]以及减少氧化应激等^[8-9]，其中抗氧化是较为公认的抗衰老途径^[10-12]。天然产物具有复杂的成分，体外抗氧化活性检测方法很难对其抗氧化成分进行评价。而生物体内存在复杂的抗氧化系统，体内抗氧化活性检测也存在一定的难度。本实验首次采用高效液相紫外荧光 (HPLC-UV-FLD) 结合显微注射荧光探针技术的新型系统，在体内和体外对恭城油茶中的抗氧化活性成分进行筛选及验证，为恭城瑶族长寿饮食文化的进一步开发提供理论依据。

1 材料

1.1 主要材料及试剂

恭城油茶以绿茶 *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze. 为原料，购自桂林恭城福龙康食品科技有限公司，由广西中医药大学郝二伟教授鉴定。ISO4 品系果蝇，由南开大学吴世安课题组赠予；过氧化氢荧光探针分子 (NBCD)，由南开大学尹正课题组提供；羟自由基清除能力检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)；维生素 C (天津索罗门生物科技有限公司)；氯化血红素 (上海迈瑞尔化学技术有限公司)；4-羟基苯乙酸 (美国 Sigma-Aldrich 公司)；表没食子儿茶素 (EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 和表儿茶素没食子酸酯 (ECG) (北京索莱宝科技有限公司，经 HPLC 检测质量分数均 $\geq 98\%$)；化学发光辣根过氧化物酶底物 (HRP，美国 Millipore 公司)；液相色谱 (LC) 级乙腈 (美国 Fisher 公司)；LC 级甲酸 (比利时 Acros Organics 公司)；其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

MilliQ 水纯化系统 (美国 Millipore 公司)；万分之一电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]；SB-25-12DT 超声清洗仪 (宁波新芝生物科技有限公司)；倒置荧光显微镜 (日本尼康)；CCD 相机 (德国巴尔斯)；机动显微操纵器 (美国萨特)；

CCD 相机的分辨率为 640×480 像素，微型喷射器的最大输出压力为 150 kPa。显微操纵器的操纵范围为 $(25 \times 25 \times 25) \text{ mm}^3$ ，可重复性在 $0.2 \sim 0.4 \text{ }\mu\text{m}$ ，最高速度为 2.9 mm/s ^[13]。

2 方法

2.1 色谱条件

HPLC 条件：Agilent Zorbax C₁₈ ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ， $5 \text{ }\mu\text{m}$) 色谱柱。流动相为乙腈 (B) -0.1% 甲酸水 (A) 梯度洗脱。梯度洗脱：0~35 min，5%~35% B；35~45 min，35%~100% B；45~50 min，100% B；50~55 min，100%~5% B。体积流量 1.0 mL/min ，检测波长 274 nm，柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ，进样量 $10 \text{ }\mu\text{L}$ 。衍生化试剂：体积流量 0.2 mL/min ，反应管内径 0.34 mm 、长 3 m 的聚四氟乙烯螺线管，荧光检测器的激发波长为 315 nm，发射波长为 400 nm。

UPLC 液相色谱条件：Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ， $1.7 \text{ }\mu\text{m}$)。流动相：乙腈 (A) -0.1% 甲酸水 (B)，梯度洗脱：0~18 min，2%~35% A；18~23 min，35%~100% A；23~25 min，100% A；25~27 min，100%~5% A。体积流量 0.4 mL/min ；柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ；进样量 $4 \text{ }\mu\text{L}$ ；仪器设置条件参考文献报道^[14]。

2.2 样品的制备

称取恭城油茶 1.00 g ，加入 10 mL 水超声提取 (功率 250 W ，频率 50 kHz) 30 min 。 $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 15 min ，取上清用 $0.42 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜滤过，用于色谱分析。衍生化试剂的配制方法参考文献报道^[15]。

2.3 过氧化氢急性损伤实验

收集 3 d 内羽化的雌性成虫 600 只，随机分为 3 组 (模型组、 0.5 mmol/L EGCG 组、 10 mg/mL 恭城油茶组)，培养 14 d，饥饿 2 h 后，将果蝇放入干净灭菌的培养管中，培养管底部放 5 片圆形的滤纸，加入 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 含有 30% H_2O_2 的 6% 葡萄糖溶液^[16]，每小时记录果蝇的死亡只数，直至果蝇全部死亡，绘制果蝇生存曲线。计算果蝇的平均寿命和最高寿命。

2.4 羟自由基清除能力实验

称取 10 g 恭城油茶，加入 100 mL 水超声提取 30 min ，利用水分测定仪测定提取液的水分。稀释成质量浓度为 1.8 、 2.4 、 3.0 、 3.6 、 4.2 mg/mL 的恭城油茶样品溶液。分别配制质量浓度为 1.0 mg/mL

的 EGCG 和维生素 C 母液, 将 EGCG 依次稀释为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。将维生素 C 依次稀释为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL 的溶液。按照试剂盒说明进行操作, 536 nm 下测定试剂盒自带的空白管、对照管和测定管的吸光度 (A) 值, 分别记为 $A_{\text{空}}$ 、 $A_{\text{对}}$ 和 $A_{\text{测}}$, 计算羟自由基清除率 (D)。

$$D = (A_{\text{测}} - A_{\text{对}}) / (A_{\text{空}} - A_{\text{对}})$$

2.5 果蝇培养条件及显微注射荧光探针

培养基的配制方法及果蝇的培养条件参考文献方法^[17]。在基础培养基中加入 EGCG, 充分搅拌, 配制成 0.5 mmol/L 的给药培养基。收集 3 d 内羽化的雌性成虫 500 只, 随机分为 3 组 (空白对照组、0.5 mmol/L EGC、EGCG 和 ECG 组、模型组), 每组 100 只, 培养 14 d, 进行过氧化氢刺激如“2.3”项所述, 6 h 后随机挑选 1 只果蝇放入含有滤纸条的培养管, 加入 50 μL 乙醚麻醉 1 min, 放置于共聚焦培养皿盖中, 在放大倍数为 10 倍的立体显微镜下利用机械手臂在果蝇胸肌注射 30 nL 浓度为 5 mmol/L 的 NBCD^[18], 切换为荧光显微镜照射, 放大倍数为 6 倍进行拍摄。利用 Image-pro Plus 软件对 5 min 拍摄的照片进行荧光度值分析, 每组至少计算 3 只。

2.6 数据处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS statistics16.0 和 Graphpad prism 6 等软件对实验数据进行统计学分析。给药组与对照组间生存率比较采用 Log-rank 检验, 最高寿命以及平均荧光度值的比较应用 One-way ANOVA 分析。

3 结果

3.1 油茶及 EGCG 对过氧化氢损伤雌蝇寿命的影响

H_2O_2 损伤后, 不同时间雌蝇存活率的统计分析结果显示 (图 1), 与模型组相比, EGCG 和恭城油

茶组雌蝇的存活率明显提高 ($P < 0.001$)。如表 1 所示, 与模型组相比, 膳食中添加 0.5 mmol/L EGCG、10 mg/mL 恭城油茶可分别提高雌蝇平均寿命 24.61% 和 22.31%, 均提高最高寿命 15.66% ($P < 0.001$)。结果说明恭城油茶与 EGCG 均能提高雌蝇抵抗过氧化氢损伤的能力, 延长寿命。

3.2 维生素 C、油茶及 EGCG 的羟自由基清除能力

羟自由基是最具有活性的活性氧, 羟自由基清除能力是评价物质的抗氧化性的重要指标^[19]。维生素 C 是公认的抗氧化剂, EGCG 是茶叶中主要的活性成分。结合图 2 及表 2 可知, 维生素 C、恭城油茶及 EGCG 对羟自由基均有清除作用, 当清除率达

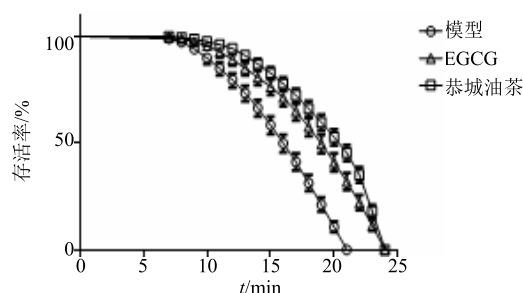


图 1 恭城油茶和 EGCG 对过氧化氢急性损伤雌蝇存活率的影响

Fig. 1 Lifespan curves of female *D. melanogaster* fed diets supplemented with Gongcheng Tea or EGCG

表 1 恭城油茶及 EGCG 对过氧化氢损伤雌性果蝇寿命的影响

Table 1 Effects of Gongcheng Tea and EGCG on lifespan of female *D. melanogaster*

组别	果蝇数量	平均寿命/h	最长寿命/h
模型	161	13.0 $\pm$ 0.9	19.8 $\pm$ 2.1
EGCG	130	16.2 $\pm$ 1.1***	22.9 $\pm$ 0.7***
恭城油茶	116	15.9 $\pm$ 1.0***	22.9 $\pm$ 1.0***

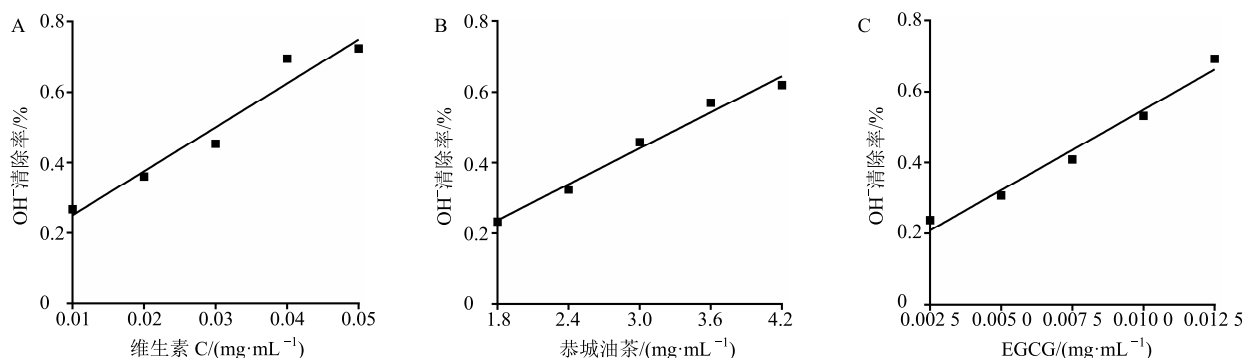


图 2 维生素 C (A)、恭城油茶 (B) 及 EGCG (C) 的羟自由基清除能力

Fig. 2 Clearance of $\text{OH}^\cdot$ activity of Vitamin C, Gongcheng Tea, and EGCG

表 2 维生素 C、恭城油茶及 EGCG 的浓度与清除率的线性关系及清除能力

Table 2 Linear relation between concentration and clearance and clearance ability of Vitamin C, Gongcheng Tea, and EGCG

组别	线性方程	r^2	$D_{50}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
维生素 C	$Y=12.479 X+0.126 2$	0.949 5	0.030
恭城油茶	$Y=0.169 8 X-0.068 4$	2.541 8	2.542
EGCG	$Y=45.424 X+0.095 1$	0.977 2	0.009

到 50%(D_{50})时,维生素 C 质量浓度为 0.030 mg/mL,油茶浓度为 2.542 mg/mL, EGCG 质量浓度为 0.009 mg/mL,表明维生素 C、恭城油茶及 EGCG 对羟基自由基的清除能力不同,EGCG>维生素 C>恭城油茶。

3.3 HPLC-UV-FLD 在线筛选抗氧化成分及 NBCD 检测过氧化氢的反应原理

HPLC-UV-FLD 系统原理是基于在氯化血红素的专一催化作用下,过氧化氢能够使无荧光的 4-羟

基苯乙酸(HPHAA)转化为有强荧光的 2,2'-二羟基-联苯-5,5'-二乙酸(图 3-A)。本实验对原有方法进行了改进^[20-22],经过色谱柱分离的抗氧化成分依次在反应管中消耗过氧化氢,减少衍生反应生成的荧光物质,通过荧光检测器检测得到相应的峰。过氧化氢荧光探针 NBCD 检测过氧化氢水平的原理是 NBCD 与果蝇体内的过氧化氢反应生成具有荧光的物质 resorufin^[23](图 3-B)。

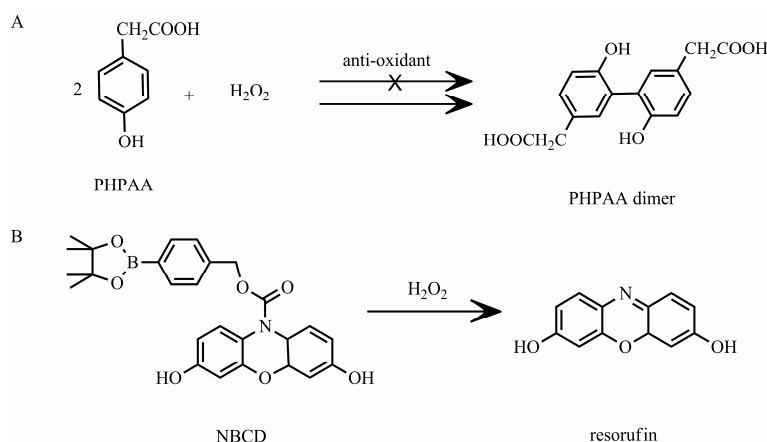


图 3 HPLC-UV-FLD 在线筛选抗氧化成分及 NBCD 检测过氧化氢的反应原理

Fig. 3 Principles of on-line screening of anti-oxidant components by HPLC-UV-FLD system and determination of H_2O_2 within living *D. melanogaster* using NBCD

3.4 恭城油茶主要抗氧化活性成分在线筛选

本实验采用 HPLC-UV-FLD 系统对恭城油茶中能够快速清除过氧化氢的活性成分进行筛选。首先油茶提取物通过色谱柱分离,得到其成分峰(图 4-a)。其次在以 HPHAA 为底物,氯化血红素为催化剂的衍生反应中,经色谱柱分离的油茶中抗氧化成分通过快速消耗过氧化氢来减缓衍生反应的发生,降低荧光产物的生成量,由荧光检测器检测输出相应的色谱峰如图 4-b 所示,由图 4-b 可看出恭城油茶中能够快速清除过氧化氢的主要活性成分是峰 1、2 和 3,峰面积的大小与其含量及清除过氧化氢的速率有关^[22]。

3.5 恭城油茶主要抗氧化活性成分鉴定

利用 UPLC-Q/TOF-MS 系统对收集得到的峰 1、2 和 3 进行结构分析。通过与对照品质谱信息对照,

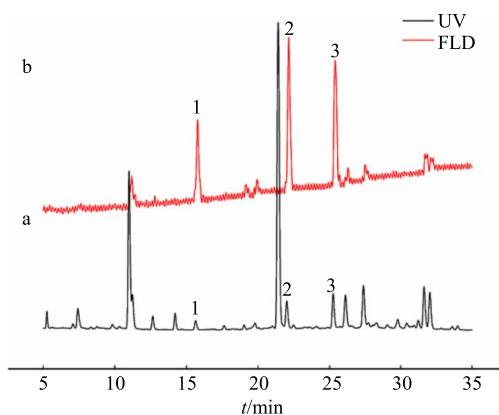


图 4 恭城油茶提取液的紫外检测 (a) 以及柱后衍生荧光 (b) 色谱图

Fig. 4 Ultraviolet chromatogram (a) and post-column derivatization with Fluorescence chromatogram (b) of extracts of Gongcheng Tea

鉴定出恭城油茶中的 3 种主要抗氧化成分分别为 EGC、EGCG 和 ECG，具体质谱信息及裂解规律如图 5 所示。

3.6 显微注射荧光探针检测果蝇体内过氧化氢含量

荧光探针 NBCD 能与过氧化氢反应生成具有荧光的化合物，通过对果蝇体内平均荧光光密度值的检测反应果蝇体内过氧化氢的水平，并且不会对活体果蝇产生严重的不良影响^[24]。恭城油茶及活性成分喂养果蝇 14 d 后，过氧化氢荧光探针 NBCD 经果蝇胸肌注射 5 min 后的荧光图片见图 6-A，红色荧光的强度及位置代表过氧化氢的水平及范围。对应的各组荧光图片的平均荧光光密度值见图

6-B，结果表明，过氧化氢刺激 6 h 能够显著提高果蝇体内过氧化氢水平。与模型组相比，10 mg/mL 恭城油茶、0.5 mmol/L EGC、EGCG 和 ECG 组果蝇体内的平均荧光光密度显著降低，结果表明恭城油茶、EGC、EGCG 和 ECG 能够显著清除果蝇体内过氧化氢 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

茶叶中含有多种抗氧化成分，主要是茶多酚和儿茶素^[25-27]，但是尚未有研究对其中能够快速清除过氧化氢的抗氧化活性成分进行筛选，本实验利用 HPLC-UV-FLD 衍生系统筛选出恭城油茶中能够快速清除过氧化氢的 3 种主要抗氧化活性成分，通过

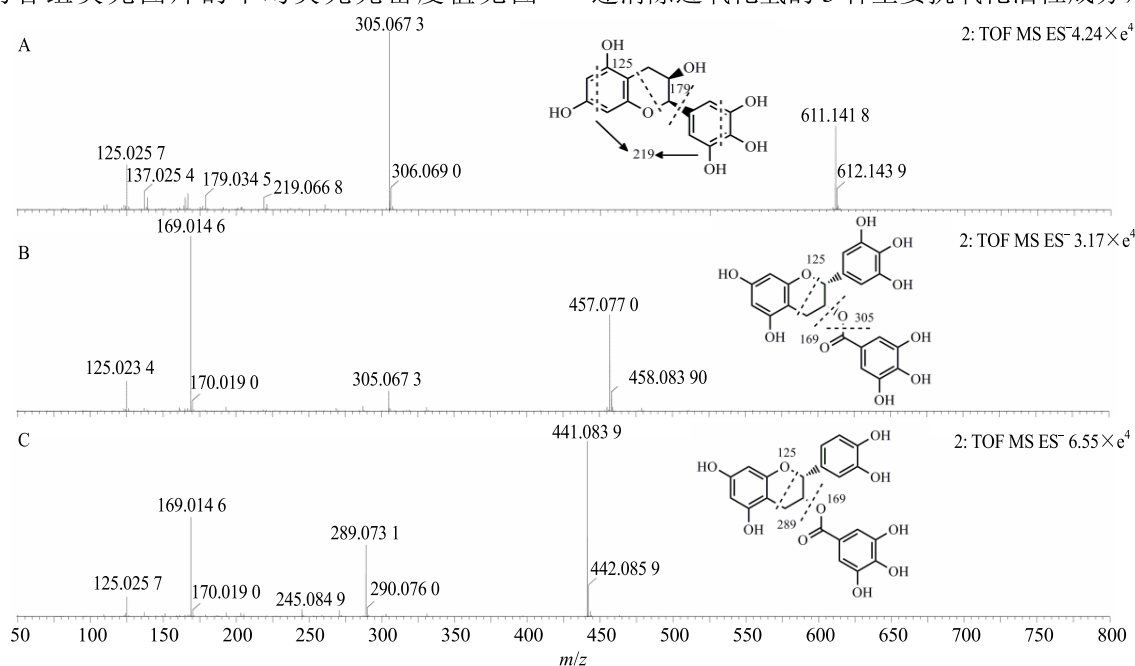
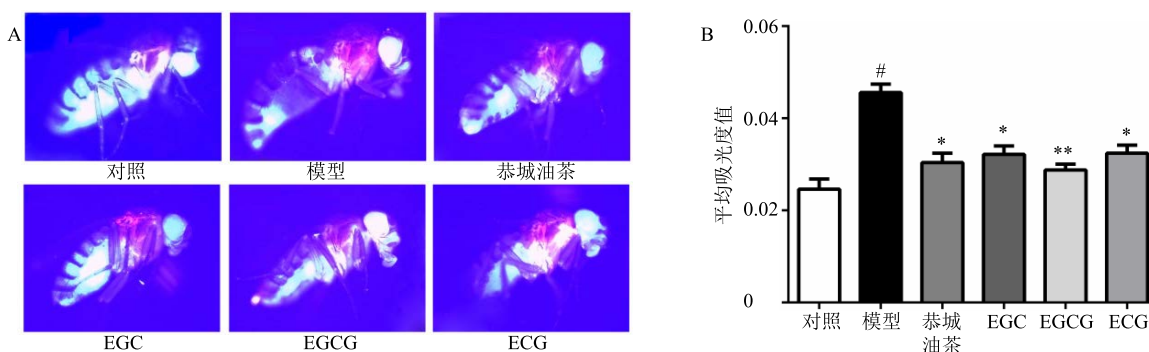


图 5 EGC (A)、EGCG (B) 和 ECG (C) 的质谱裂解规律

Fig. 5 Fragmentation pathways of EGC (A), EGCG (B), and ECG (C)



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 6 活体果蝇荧光图 (A) 及平均吸光度值 (B)

Fig. 6 Fluorescent images of living *D. melanogaster* (A) and mean density (B)

液相质谱信息鉴定为 EGC、EGCG 和 ECG。有研究表明, EGCG、EGC 和 ECG 的抗氧化活性强弱顺序为 EGCG>EGC>ECG^[28-31]。体外抗氧化活性检测不能模拟真实的生理环境, 机体内存在复杂的抗氧化酶系统、活性氧、抗氧化物等, 因此通过高灵敏度、高选择性的荧光探针检测生物体内活性氧水平更能直观准确地反映抗氧化剂在体内的抗氧化作用。目前大量的研究表明, 荧光探针在应用中存在的问题, 主要是选择性差、自身荧光强度高、检测过程中需要一定的 pH、易受机体内的抗氧化剂及细胞色素 c 的影响、对生物体产生严重伤害等^[32-35]。因此本实验利用兼具敏感性与特异性的荧光探针 NBCD 技术对恭城油茶及其中抗氧化活性成分喂养 14 d 的果蝇体内的过氧化氢水平进行检测, 结果表明恭城油茶及 EGC、EGCG 和 ECG 对果蝇体内的过氧化氢均有显著清除作用, 并结合生物学方法, 优化了荧光探针的检测效率。通过显微注射荧光探针实验过程中遇到的问题, 总结出应用荧光探针时的注意事项: 首先应确定探针的最适浓度及注射体积, 最大限度降低其对生物体的损伤; 其次应注意控制注射时的推动压力, 防止压力过大导致注入空气; 最后应根据荧光探针的特性选择合适的反应时间, 减少荧光淬灭产生的影响。

综上所述, 本实验基于 HPLC-UV-FLD 方法和显微注射荧光探针技术对恭城油茶在体外和体内的抗氧化能力进行研究, 发现 HPLC-UV-FLD 衍生系统具有应用于筛选和评价天然产物中抗氧化活性成分的实用价值。同时机器人手臂微流体注射与显微成像分析相结合的系统实现了生物体内过氧化氢的“在线检测”和“可视化”。该新型综合系统为阐明过氧化氢在生命过程中的作用提供强有力的手段, 为恭城油茶的抗衰老及抗氧化作用研究和进一步开发利用提供了物质基础。

参考文献

- [1] 王者嵩, Tracy. 恭城油茶户户香 [J]. 中国烹饪, 2013, 3: 57-57.
- [2] 姜伟. 恭城油茶香满天 [J]. 茶: 健康天地, 2011, 1: 34-35.
- [3] 何顺. 少数民族饮食文化在现代都市中的传承探讨——以广西桂林恭城油茶为例 [J]. 南宁职业技术学院学报, 2017, 22(5): 20-23.
- [4] 杨成林. 六大因素造就长寿之乡——介绍广西恭城县 [J]. 长寿, 2016, 4: 10-11.
- [5] Clancy D J, Gems D, Hafen E, *et al.* Dietary restriction in long-lived dwarf flies [J]. *Science*, 2002, 296(5566): 319.
- [6] Decabo R, Carmona-Gutierrez D, Bernier M, *et al.* The search for antiaging interventions: From elixirs to fasting regimens [J]. *Cell*, 2014, 157(7): 1515-1526.
- [7] D'Adda D F F, Reaper P M, Clayfarrace L, *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence [J]. *Nature*, 2003, 426(6963): 194-198.
- [8] Wang M C, Bohmann D, Jasper H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila* [J]. *Dev Cell*, 2003, 5(5): 811-816.
- [9] Christina C, Landis G N, Donna F, *et al.* Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(12): R262.
- [10] 郭育. 太白槲木皂苷抗衰老作用及机制研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2013.
- [11] Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. *J Signal Transduction*, 2012, doi: 10.1155/2012/646354.
- [12] 宋朝春, 魏冉磊, 樊晓兰, 等. 衰老及抗衰老药物的研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 163-170.
- [13] Li N, Liu Y, Li S, *et al.* High-precision, pressure-driven pump for sub-picoliter scale quantitative injection [J]. *Modern Physics Lett B*, 2017, 31(13): 1750148.
- [14] Gao J, Tao J, Zhang N, *et al.* Formula optimization of the Jiashitang scar removal ointment and antiinflammatory compounds screening by NF- κ B bioactivity-guided dual-luciferase reporter assay system [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(2): 241-250.
- [15] 徐金荣, 陈忠明. 高效液相色谱-荧光检测法测定环境样品中的过氧化物 [J]. 色谱, 2005, 23(4): 366-369.
- [16] Peng C, Zuo Y, Kwan K M, *et al.* Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster* [J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47(2): 170-178.
- [17] 段丹丹, 高丽, 王珂欣, 等. 黄芩素通过抗氧化应激延长果蝇寿命的机制 [J]. 药学学报, 2016, 51(9): 1401-1406.
- [18] Cochemé H M, Logan A, Prime T A, *et al.* Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living *Drosophila* [J]. *Nat Protocols*, 2012, 7(5): 946-958.
- [19] Cheignon C, Tomas M, Bonnefontrousselot D, *et al.* Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 450-464.
- [20] Hong J, Maguhn J, Freitag D, *et al.* Determination of H₂O₂ and organic peroxides by high-performance liquid chromatography with post-column UV irradiation, derivatization and fluorescence detection [J].

- Fresenius J Anal Chem*, 1998, 361(2): 124-128.
- [21] Wang K, Glaze W H. High-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization for simultaneous determination of organic peroxides and hydrogen peroxide [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 1083(1/2): 219-222.
- [22] Chu G, Cheng D, Liu W, *et al.* Screening and evaluation of antioxidants from lees by micro-injector systems combined with a fluorescent probe, *N*-borylbenzyloxycarbonyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, in living *Drosophila* [J]. *Chin Chem Lett*, 2018, 29(10): 1521-1527.
- [23] Miwa S, Treumann A, Bell A, *et al.* Carboxylesterase converts amplex red to resorufin: Implications for mitochondrial H₂O₂ release assays [J]. *Free Rad Biol Med*, 2015, 90: 173-183.
- [24] Han Z, Liang X, Ren X, *et al.* A novel 3, 7-dihydroxyphenoxazine-based fluorescent probe for selective detection of intracellular hydrogen peroxide [J]. *Chem Asian J*, 2016, 11(6): 818-822.
- [25] 丁阳平, 陆昌琪, 候宏晓, 等. 儿茶素氧化产物及形成机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 239-253.
- [26] 张心亚, 禄子薇, 张双琳, 等. 普洱茶多酚的提取及抗氧化作用 [J]. 当代教育实践与教学研究: 电子版 2017(3): 241-242.
- [27] 刘大美, 毕宏生, 解孝锋, 等. 茶多酚体内抗氧化作用研究进展 [J]. 山东医药, 2013, 53(16): 82-84.
- [28] Lee L S, Kim S H, Kim Y B, *et al.* Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9173-9186.
- [29] Shrestha R, Lama J P, Shrestha K. Total polyphenols content and antioxidant activity of different tea commercially produced in nepal [J]. *J Food Sci Technol Nepal*, 2010, 6: 73-79.
- [30] Ahmad R S, Butt M S, Huma N, *et al.* Quantitative and qualitative portrait of green tea catechins (Gtc) through HPLC [J]. *Inter J Food Properties*, 2014, 17(7): 1626-1636.
- [31] Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids [J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(6): 753-758.
- [32] Hou Y, Zhou J, Gao Z, *et al.* A Protease-activated ratiometric fluorescent probe for pH-mapping of malignant tumor [J]. *Adv Sci Technol*, 2016, 102(3): 51-56.
- [33] Wu Y T, Shanmugam C, Tseng W B, *et al.* A gold nanocluster-based fluorescent probe for simultaneous pH and temperature sensing and its application to cellular imaging and logic gates [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(21): 11210-11216.
- [34] Zhang S, Sun M, Yan Y, *et al.* A turn-on fluorescence probe for the selective and sensitive detection of fluoride ions [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(8): 2075-2081.
- [35] Zhao Y J, Miao K, Zhu Z, *et al.* Fluorescence quenching of a conjugated polymer by synergistic amine-carboxylic acid and π - π interactions for selective detection of aromatic amines in aqueous solution [J]. *ACS Sensors*, 2017, 2(6): 842-847.