

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310101525.6

[51] Int. Cl.

C07D 311/62 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

C09K 15/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100357287C

[22] 申请日 1995.10.3

[21] 申请号 200310101525.6

分案原申请号 95196595.6

[30] 优先权

[32] 1994.10.3 [33] US [31] 08/317226

[73] 专利权人 火星有限公司

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 小·L·J·罗曼兹耶克

小·J·F·汉默斯通

M·M·布克

[56] 参考文献

US4797421A 1989.1.10

US 4704292A 1987.11.3

审查员 田 芳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 1 页 说明书 33 页 附图 91 页

[54] 发明名称

抗赘生物的可可提取物及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明公开并要求保护的是例如多酚或原花青素多酚的可可提取物, 制备该提取物的方法, 及其应用, 特别是作为抗赘生物药剂和抗氧化剂的应用。公开并要求保护的是含可可多酚或原花青素多酚的组合物, 用该组合物治疗病人的方法。同时公开并要求保护的是一种用于治疗病人的试剂盒, 它带有包含可可多酚或原花青素多酚的抗赘生物药剂, 以及包含可可多酚或原花青素多酚的冰冻干燥的抗赘生物组合物。此外, 公开并要求保护的是本发明在抗氧化剂、防腐剂和拓扑异构酶抑制组合物上的应用及方法。

1. 一种基本上纯的可可提取物，其包含原花青素寡聚物 3-12。
- 2 权利要求 1 的提取物，其制备过程包括：
把可可豆粉碎成粉末，
对粉末进行脱脂，和
从粉末中提取并纯化可可多酚。
3. 权利要求 2 的提取物，其中所述的把可可豆粉碎成粉末的过程包括：
冻干豆和果肉，
从冻干的团块中去除果肉，
去除冻干可可豆的壳，和
研磨去壳的豆。
4. 权利要求 2 或 3 的提取物，其中所述的过程还包括用凝胶渗透色谱和/或用制备型高效液相色谱（HPLC）纯化提取物。
5. 权利要求 1 的提取物，其主要由原花青素寡聚物 5-12 组成。

抗赘生物的可可提取物及其制备方法和应用

发明领域

本发明涉及这样一些可可提取物，它们是例如多酚，优选的是富含原花青素(procyanidin)的多酚。本发明也涉及这些提取物的制备方法及应用；它们被作为例如抗赘生物(antineoplastic)药剂和抗氧化剂。

本发明公开中所引用文献的全部出处列在说明书末尾，权利要求之前的“参考文献”部分。这些文献属于本发明领域并在此引入作为参考。

发明背景

多酚是一类种类多得惊人的化合物(Ferreira 等, 1992), 广泛存在于不同的植物中, 其中一些进入食物链。在某些情况下, 它们代表人类饮食中重要的一类化合物。尽管人们认为某些多酚是没有营养的, 但是由于它们可能对健康带来益处, 人们对这些化合物还是产生了兴趣。例如, 在实验动物研究中, 槲皮苷(黄酮类化合物)显示出抗致癌作用(Deshner 等, 1991 和 Kato 等, 1983)。(+) -儿茶素和(-)-表儿茶素(3-黄烷醇类化合物)显示出抑制白血病病毒逆转录酶的活性(Chu 等, 1992)。Nobotanin(一种寡聚可水解单宁)也具有抗肿瘤的活性(Okuda 等, 1992)。统计资料表明, 日本产茶区的胃癌死亡率明显较低。据报导, 表儿茶素鞣酸盐是绿茶中抑制小鼠皮肤瘤的药物活性成分(Okuda 等, 1992)。鞣花酸对不同动物肿瘤模型也具有抗致癌活性(Bukharta 等, 1992)。最后, 原花色青素(proanthocyanidin)寡聚物由 Kikkoman 公司为我们申请了专利, 用作抗诱变剂。其实, 最近在第 202 届美国化学学会国家会议上已提出了食物中的酚类化合物的范围和它们对实验动物模型中肿瘤发育的调节作用(Ho 等, 1992; Huang 等, 1992)。

但是, 这些报道没有讲述或建议可可提取物、任何一种制备该提取物的方法或可可提取物的任何一种作为抗赘生物药剂的应用。

由于未发酵的可可豆含有丰富的多酚, 所以本发明人考虑到通过从可可中提取化合物并筛选提取物的活性, 可以找到可可提取物(例如可可中的化合物)的相似的活性和应用。国家癌症研究所从各种可可和 *Herrania* 中筛选抗癌活性物质, 作为他们的庞大的天然产品筛选计划的一部分。据报导, 可可组织的一些提取物活性低, 于是工作没有深入进行。因此, 在

抗赘生物或抗癌领域，可可和它的提取物并不被认为是有用的；也就是说，抗赘生物或抗癌领域的经验使得该领域的技术人员没有把可可和它的提取物用于癌症治疗。由于发展了一些用于研究可可多酚在味道形成中的作用的分析方法（Clapperton 等，1992），本发明人决定用相似的方法来制备用于抗癌筛选的样品，而与抗赘生物或抗癌领域的知识不同。另人惊讶的是，与本领域的知识（例如国家癌症研究所的筛选方法）不同，本发明人发现含有原花青素的可可多酚提取物明显地具有抗癌或抗赘生物药剂的作用。此外，本发明人证明含有原花青素的可可提取物可用作抗氧化剂。

发明目的和发明概述

本发明的一个目的是为制备可可提取物提供一种方法。

本发明的另一目的是提供一种可可提取物。

本发明的另一目的是提供一种抗氧化剂组合物。

本发明的另一目的是表明 DNA 拓扑异构酶 II 的酶活性的抑制。

本发明的另一目的是为肿瘤或癌症治疗提供一种方法。

本发明的另一目的是提供抗癌、抗肿瘤或抗赘生物的组合物。

本发明的另一目的是提供制备抗癌、抗肿瘤或抗赘生物的组合物的方法。

本发明的另一目的是提供用于肿瘤或癌症治疗的试剂盒。

人们惊讶地发现可可提取物具有抗癌、抗肿瘤或抗赘生物活性；或者，它是一种抗氧化剂组合物，或它能抑制 DNA 拓扑异构酶 II 的酶活性。因此本发明提供一种基本上纯的可可提取物。该提取物优选地含有多酚，例如富含可可原花青素的多酚，例如至少一种原花青素的多酚，其中原花青素选自：(-)表儿茶素、原花青素 B-2、原花青素寡聚物 2-12 优选 2-5 或 4-12、原花青素 B-5、原花青素 A-2 和原花青素 C-1。本发明也提供一种抗肿瘤、抗癌或抗赘生物组合物，或抗氧化剂或 DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂组合物，该组合物包含基本上纯的可可提取物或合成的可可多酚（例如富含原花青素的多酚）和合适的载体。该提取物优选地含有可可原花青素。优选地通过如下方法得到可可提取物：将可可豆变成粉末，将粉末脱脂，从粉末中提取活性化合物。

本发明还涉及一种用于治疗需要用抗癌、抗肿瘤或抗赘生物药剂或抗氧化剂或 DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂治疗的病人的方法，该方法包括给病

人施用一种组合物,这种组合物包含有效量的基本上纯的可可提取物或合成的可可多酚或原花青素和载体。可可提取物可以是可可原花青素;优选地通过将可可豆变成粉末,将粉末脱脂和从粉末中提取活性化合物而获得。

此外,本发明为需要用抗癌、抗肿瘤或抗赘生物药剂或抗氧化剂或DNA拓扑异构酶II抑制剂治疗的病人提供了一种试剂盒,该试剂盒包含基本上纯的可可提取物或合成的可可多酚或原花青素,以及用于与提取物或合成的多酚或原花青素混合的合适载体。

这些目的以及其它目的及实施方案将在下面的发明详述中公开或是显而易见的。

附图简述

参照附图可更好地理解下面的发明详述:

图1给出了可可原花青素粗提物体的典型凝胶渗透色谱;

图2A给出了显示从未发酵可可中提取的可可原花青素的分离(洗脱曲线)的典型反相HPLC色谱;

图2B给出了显示从未发酵可可中提取的可可原花青素的分离的典型正相HPLC色谱;

图3给出了几个典型的原花青素的结构;

图4A-4B给出了五个用于筛选抗癌或抗赘生物活性级分的典型HPLC色谱;

图5和6A-6D给出了可可提取物和癌细胞ACHN(图5)以及PC-3(图6A-6D)(存活率对剂量, $\mu\text{g/ml}$); M&M2 F4/92, M&MA+E U12P1, M&MB+E Y192P1, M&MC+E U12P2, M&MD+E U12P2的剂量-反应关系;

图7A-7H给出了可可原花青素级分A、B、C、D、E、A+B、A+E、A+D和PC-3细胞系(存活率对剂量, $\mu\text{g/ml}$); MM-1A 0212P3、MM-1B 0162P1、MM-1C 0122P3、MM-1D 0122P3、MM-1E 0292P8, MM-1A/B 0292P6, MM-1A/E 0292P6, MM-1A/D 0292P6的典型剂量-反应关系;

图8A-8H给出了可可原花青素级分A、B、C、D、E、A+B、A+E、D+E和KB鼻咽/宫颈癌(Nasopharyngeal/HeLa)细胞系(存活率对剂量, $\mu\text{g/ml}$); MM-1A092K3, MM-1B 0212K5, MM-1C 0162K3, MM-1

D 0212K5, MM-1 E 0292K5, MM-1 A/B 0292K3, MM-1 B/E 0292K4, MM-1 D/E 0292K5 的典型剂量-反应关系;

图 9A-9H 给出了可可原花青素级分 A、B、C、D、E、B+D、A+E、D+E 和 HCT-116 细胞系(存活率对剂量, $\mu\text{g/ml}$); MM-1C 0192H5, D 0192H5, E 0192H5, MM-1 B&D 0262H2, A/E 0262H3, MM-1 D&E 0262H1 的典型剂量-反应关系;

图 10A-10H 给出了可可原花青素级分 A、B、C、D、E、B+D、C+D、A+E 和 ACHN 肾细胞系(存活率对剂量, $\mu\text{g/ml}$); MM-1A 092A5, MM-1 B 092A5, MM-1 C 0192A7, MM-1 D 0192A7, M&M1 E 0192A7, MM-1 B&D 0302A6, MM-1 C&D 0302A6, MM-1 A&E 0262A6 的典型剂量-反应关系;

图 11A-11H 给出了可可原花青素级分 A、B、C、D、E、A+E、B+E、C+E 和 A-549 肺细胞系(存活率对剂量, $\mu\text{g/ml}$); MM-1A 019258, MM-1 B 09256, MM-1 C 019259, MM-1 D 019258, MM-1 E 019258, A/E 026254, MM-1 B&E 030255, MM-1 C&E N6255 的典型剂量-反应关系;

图 12A-12H 给出了可可原花青素级分 A、B、C、D、E、B+C、C+D、D+E 和 SK-5 黑色素瘤细胞系(存活率对剂量, $\mu\text{g/ml}$); MM-1A 0212S4, MM-1 B 0212S4, MM-1 C 0212S4, MM-1 D0212S4, MM-1 E N32S1, MM-1 B&C N32S2, MM-1 C&D N32S3, MM-1 D&E N32S3 的典型剂量-反应关系;

图 13A-13H 给出了可可原花青素级分 A、B、C、D、E、B+C、C+E、D+E 和 MCF-7 乳腺细胞系(存活率对剂量, $\mu\text{g/ml}$); MM-1A N22M4, MM-1 B N22M4, MM-1 C N22M4, MM-1 D N22M3, MM-1 E 0302M2, MM-1 B/C 0302M4, MM-1 C&E N22M3, MM-1 D&E N22M3 的典型剂量-反应关系;

图 14 给出了可可原花青素(特别是级分 D)和 CCRF-CEM T 细胞白血病细胞系的典型剂量-反应关系(细胞/ml 对生长天数; 空心圆是对照, 实心圆是 $125\mu\text{g}$ 级分 D, 空心倒三角是 $250\mu\text{g}$ 级分 D, 实心倒三角是 $500\mu\text{g}$ 级分 D);

图 15A 给出了用 XTT 和结晶紫对经级分 D+E 处置过的 MCF-7 p168 乳腺癌细胞进行细胞毒性分析的比较结果(空心圆代表 XTT, 实心圆代表结晶紫);

图 15B 给出了用从 UIT-1 可可属型中获得的不同水平的粗多酚处理 MDA MB231 乳腺细胞系的典型剂量反应曲线（吸收值（540nm）对天数；空心圆是对照，实心圆是媒液，空心倒三角是 250 μ g/ml，实心倒三角是 100 μ g/ml，空心方块是 10 μ g/ml；酶标板读数器的最高值是 2.0，也许不足以代表细胞数）；

图 15C 给出了用从 UIT-1 可可属型中获得的不同水平的粗多酚处理 PC-3 前列腺癌细胞系的典型剂量反应曲线（吸收值（540nm）对天数；空心圆是对照，实心圆是媒液，空心倒三角是 250 μ g/ml，实心倒三角是 100 μ g/ml，空心方块是 10 μ g/ml）；

图 15D 给出了用从 UIT-1 可可属型中获得的不同水平的粗多酚处理 MCF-7 p168 乳腺癌细胞系的典型剂量反应曲线（吸收值（540nm）对天数；空心圆是对照，实心圆是媒液，空心倒三角是 250 μ g/ml，实心倒三角是 100 μ g/ml，空心方块是 10 μ g/ml，实心方块是 1 μ g/ml；酶标板读数器的最高值是 2.0，也许不足以代表细胞数）；

图 15E 给出了用从 UIT-1 可可属型中获得的不同水平的粗多酚处理 Hela 宫颈癌细胞系的典型剂量反应曲线（吸收值（540nm）对天数；空心圆是对照，实心圆是媒液，空心倒三角是 250 μ g/ml，实心倒三角是 100 μ g/ml，空心方块是 10 μ g/ml，酶标板读数器的最高值是 2.0，也许不足以代表细胞数）；

图 15F 给出了用不同的可可多酚级分处理 Hela 宫颈癌细胞系的细胞毒效应（吸收值（540nm）对天数；空心圆是 100 μ g/ml 的 A-E，实心圆是 100 μ g/ml 的 A-C，空心倒三角是 100 μ g/ml 的 D&E；酶标板读数器的最高值是 2.0，也许不足以代表细胞数）；

图 15G 给出了用不同的可可多酚级分处理 SKBR-3 乳腺癌细胞系的细胞毒效应（吸收值（540nm）对天数；空心圆是 A-E，实心圆是 A-C，空心倒三角是 D&E）；

图 15H 给出了可可原花青素级分 D+E 和 Hela 细胞的典型剂量-反应关系（吸收值（540nm）对天数；空心圆是对照，实心圆是 100 μ g/ml，空心倒三角是 75 μ g/ml，实心倒三角是 50 μ g/ml，空心方块是 25 μ g/ml，实心方块是 10 μ g/ml；酶标板读数器的最高值是 2.0，也许不足以代表细胞数）；

图 15I 给出了可可原花青素级分 D+E 和 SKBR-3 细胞的典型剂量-反应关系（吸收值（540nm）对天数；空心圆是对照，实心圆是 100 μ g/ml，

空心倒三角是 75 μ g/ml, 实心倒三角是 50 μ g/ml, 空心方块是 25 μ g/ml, 实心方块是 10 μ g/ml);

图 15J 给出了用软琼脂克隆法分析可可原花青素级分 D+E 和 Hela 细胞的典型剂量-反应关系(条状图; 集落数目对对照、1、10、50、100 μ g/ml);

图 15K 给出了当用从八个不同可可属型中获得的粗多酚提取物处理 Hela 细胞时的生长抑制率(%百分数对浓度, μ g/ml; 空心圆是 C-1, 实心圆是 C-2, 空心倒三角是 C-3, 实心倒三角是 C-4, 空心方块是 C-5, 实心方块是 C-6, 空心三角是 C-7, 实心三角是 C-8; C-1=UF-12: 园艺种类=Criollo, 说明是 UF-12(巴西)可可多酚(去咖啡因的/去可可碱的)的粗提物; C-2=NA-33: 园艺种类=Forastero, 说明是 NA-33(巴西)可可多酚(去咖啡因的/去可可碱的)的粗提物; C-3=EEG-48: 园艺种类=Forastero, 说明是 EEG-48(巴西)可可多酚(去咖啡因的/去可可碱的)的粗提物; C-4=未知: 园艺种类=Forastero, 说明是未知(西非)可可多酚(去咖啡因的/去可可碱的)的粗提物; C-5=UF-613: 园艺种类=Trinitario, 说明是 UF-613(巴西)可可多酚(去咖啡因的/去可可碱的)的粗提物; C-6=ICS-100: 园艺种类=Trinitario, 说明是 ICS-100(巴西)可可多酚(去咖啡因的/去可可碱的)的粗提物; C-7=ICS-139: 园艺种类=Trinitario, 说明是 ICS-139(巴西)可可多酚(去咖啡因的/去可可碱的)的粗提物; C-8=UIT-1: 园艺种类=Trinitario, 说明是 UIT-1(马来西亚)可可多酚(去咖啡因的/去可可碱的)的粗提物;

图 15L 给出了当用从未发酵的可可豆和干可可豆中获得的粗多酚提取物处理 Hela 细胞时的生长抑制率(干可可豆通过发酵和日照; %对照对浓度, μ g/ml; 空心圆代表第 0 天的级分, 实心圆代表第一天时的级分, 空心倒三角代表第二天时的级分, 实心倒三角代表第三天时的级分, 空心方块代表第四天时的级分, 实心方块代表第九天时的级分);

图 15M 给出了经酶氧化的可可花青素对 Hela 细胞的影响(对经多酚氧化酶处理的粗可可多酚的剂量反应; %对照对浓度, μ g/ml; 实心方块代表粗 UIT-1(含咖啡因和可可碱), 空心圆代表粗 UIT-1(不含咖啡因和可可碱), 实心圆代表粗 UIT-1(多酚氧化酶催化过的));

图 15N 给出了可可原花青素复合级分 D 和 E 的典型半制备反相 HPLC 分离色谱;

图 15O 给出了可可多酚粗提物的典型半制备正相 HPLC 分离色谱;

图 16 给出了可可原花青素提取物及其馏分与合成的抗氧化剂 BHA 和 BHT 进行比较时的 Rancimat 氧化曲线 (任意单位对时间; 虚线和十字线 (+) 代表 BHA 和 BHT; * 代表 D-E; x 代表粗提物; 空心方块代表 A-C; 空心菱形代表对照);

图 17 给出的典型琼脂糖凝胶电泳显示了可可原花青素级分对拓扑异构酶 II 催化动核(kinetoplast) DNA 解链的抑制作用 (第一泳道含有 0.5 μ g 单体长度的动核 DNA 环标记物 (M); 第 2 和 20 泳道含有在 4%DMSO 但不含可可原花青素的条件下与拓扑异构酶 II 共同培养的动核 DNA (对照-C); 第 3 和 4 泳道含有在含 0.5 和 5.0 μ g/ml 可可原花青素级分 A 的条件下与拓扑异构酶 II 共同培养的动核 DNA; 第 5 和 6 泳道含有在含 0.5 和 5.0 μ g/ml 可可原花青素级分 B 的条件下与拓扑异构酶 II 共同培养的动核 DNA; 第 7、8、9、13、14 和 15 是同样在含 0.05、0.5 和 5.0 μ g/ml 可可原花青素级分 D 的条件下与拓扑异构酶 II 共同培养的动核 DNA; 第 10、11、12、16、17 和 18 是同样在含 0.05、0.5 和 5.0 μ g/ml 可可原花青素级分 E 的条件下与拓扑异构酶 II 共同培养的动核 DNA; 第 19 泳道是同样在含 5.0 μ g/ml 可可原花青素级分 E 的条件下与拓扑异构酶 II 共同培养的动核 DNA);

图 18 给出了可可原花青素级分 D 对感受态和缺陷型 DNA 修补细胞系的剂量反应关系 (残存率对 μ g/ml; 左边 xrs-6 是缺陷型 DNA 修补细胞系 MM-1 D D282X1; 右边是感受态 DNA 修补细胞系 MM-1 D D282B1);

图 19 给出了用可可级分 D+E 处理时阿霉素抗性细胞 MCF-7 与亲本细胞系 MCF-7 p168 进行比较的剂量反应曲线 (%对照对浓度 μ g/ml; 空心圆是 MCF-7 p168; 实心圆是 MCF-7 ADR);

图 20 给出了由正相半制备 HPLC 得到的 12 个级分在 100 μ g/ml 和 25 μ g/ml 水平对 Hela 细胞进行处理时的剂量反应关系 (直条图, %对照对对照和级分 1-12)。

发明详述

正如前面所论述的, 人们惊奇地发现可可提取物具有抗癌、抗肿瘤或抗赘生物活性, 抗氧化活性和抑制 DNA 拓扑异构酶 II 的活性。该提取物

的制备方法通常是：把可可豆粉碎成粉末，对粉末进行脱脂，然后从脱脂的粉末中提取活性化合物。粉末可以如下制备：冻干可可豆和果肉，从可可豆和果肉中除去果肉，去除冻干的可可豆的壳，然后粉碎去壳后的豆。活性化合物可用溶剂提取技术进行提取。可应用例如凝胶渗透色谱或用制备型高效液相色谱（HPLC）技术或综合应用这些技术对提取物进行纯化。不希望被任何具体理论所限制，已鉴定出提取物的活性成分是可可多酚，例如原花青素。这些可可多酚有显著的抗癌、抗肿瘤或抗赘生物活性，抗氧化活性和抑制DNA拓扑异构酶II的活性。

可遵从药学领域技术人员所熟知的常规技术制备这些含有创新性可可多酚或原花青素的抗癌、抗肿瘤或抗赘生物或抗氧化剂或抑制DNA拓扑异构酶II的组合物。应用医药领域技术人员熟知的技术，考虑到年龄、性别、体重、具体病人的状况和施用途径等因素，可把这些组合物施用给需要这些组合物治疗的病人。这些组合物可和其它的抗赘生物、抗肿瘤或抗癌药剂或抗氧化剂或DNA拓扑异构酶II的抑制剂联合施用或依次施用，和/或与减轻或消除这些药剂的副作用的药剂联合施用或依次施用；此时同样应考虑到年龄、性别、体重、具体病人的状况和施用途径等因素。

本发明的组合物的实例包括口服施用的固体组合物，例如胶囊、片剂、丸剂等，以及可咀嚼的固体制剂，因为本发明来源于食品（例如，可可或巧克力味的固体物），所以很适于咀嚼；用于口腔、鼻腔、肛门、阴道等孔窍的液体制剂，象悬液、糖浆或酏剂；以及胃肠外、皮下、皮内、肌肉内、静脉内施用的制剂（例如可注射施用），例如灭菌的悬液或乳浊液。但是，也许组合物中的活性成分与蛋白质复合，所以当施用到血液中时可因血液蛋白的凝集而形成血块；技术人员应考虑到这些。在这样的组合物中，活性可可提取物可与合适的载体、稀释剂、赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖等混合应用。本发明的活性可可提取物可以以冻干的形式提供，在等渗水溶液、盐水缓冲液中重建。

本发明还包括一种试剂盒，其中提供了活性可可提取物。试剂盒可包括容纳了合适的载体、稀释剂、赋形剂的单独的容器。试剂盒还可包括与可可活性提取物联合施用或依次施用的其他抗癌、抗肿瘤或抗赘生物药剂、抗氧化剂或DNA拓扑异构酶II的抑制剂和/或减轻或消除这些药剂的副作用的药剂。附加的药剂可在单独的容器内提供或与可可活性提取物混合。此外，试剂盒可包括混合或联合施用成份的说明和/或施用说明。

尽管本发明着眼于描述可可提取物（优选含有可可原花青素的），但有经验的有机化学技术人员会从这些内容意识到并想象出获得这些活性化合物的合成途径。因此，本发明包括合成的可可多酚或原花青素或它们的衍生物，包括葡萄糖苷、没食子酸化物、酯等，但并不仅限于此。

下面的非限制性实施例是仅以示例的方式给出的，并不能认为是本发明的限制，在不违背本发明精神或范围的条件下，可能存在许多表面上的变化方式。

实施例

实施例 1：可可来源和制备方法

几个 *Theobroma cacao* 属型是从世界的三个主要可可产地获得的，它们代表了可可的三个公认的园艺种类（Enriquez, 1967; Engels, 1981）。表 1 列出了本研究中所用的属型。剥开收获的可可豆荚取出带果肉的豆用于冻干。从冻干的团块中手工除去果肉，豆被用于下面的分析。首先对未发酵的冻干的可可豆进行手工去壳，用 TEKMAR 磨粉碎成细粉末，然后用重蒸的己烷作溶剂通过 Soxhlet 萃取进行过夜脱脂。残留的溶剂在环境温度下用真空除去。

表 1： *Theobroma cacao* 来源材料的描述

属型	产地	园艺种类
UIT-1	马来西亚	Trinitario
未知	西非	Forastero
ICS-100	巴西	Trinitario
ICS-39	巴西	Trinitario
UF-613	巴西	Trinitario
EEG-48	巴西	Forastero
UF-12	巴西	Criollo
NA-33	巴西	Forastero

实施例 2：原花青素的提取方法

A 方法 1

用 Jalal 和 Collin 所描述的方法（1977）的改进方法，从实施例 1

的脱脂、未发酵、冻干的可可豆中提取原花青素。原花青素是从 50 克脱脂的可可中提取的，先用 $2 \times 400\text{ml}$ 70%的丙酮/去离子水，然后用 400ml 70%甲醇/去离子水。合并提取物，溶剂在旋转蒸发器中在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 半真空的条件下蒸发掉。获得的水相用 1L 的去离子水稀释，用 $2 \times 400\text{ml}$ CHCl_3 萃取，去掉溶剂相。然后用 $4 \times 500\text{ml}$ 的醋酸甲酯对水相进行萃取，通过 Sorvall RC 28S 离心机，在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ $2000 \times g$ 的条件下离心 30 分钟破坏乳浊液，把 100-200ml 的去离子水加到混合的醋酸甲酯提取物中，溶剂在旋转蒸发器中在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 半真空的条件下蒸发掉，获得的水相部分在液氮中冷冻，然后在 LABCONCO 冻干系统中冻干。表 2 中列出了从不同的可可属型中获得的粗原花青素的量。

表 2：粗提原花青素的量

属型	产地	产量(克)
UIT-1	马来西亚	3.81
未知	西非	2.55
ICS-100	巴西	3.42
ICS-39	巴西	3.45
UF-613	巴西	2.98
EEG-48	巴西	3.15
UF-12	巴西	1.21
NA-33	巴西	2.23

B 方法 2

另外，可用 70%的丙酮水溶液从实施例 1 的脱脂、未发酵、冻干的可可豆中提取原花青素。10 克脱脂物和 100ml 溶剂调和 5-10 分钟，将浆液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $3000 \times g$ 的条件下离心 15 分钟，上清过玻璃毛柱。滤液在半真空下蒸馏，所得水相在液氮中冷冻，然后在 LABCONCO 冻干系统中冻干。所得粗提原花青素的范围为 15-20%。

不希望被任何具体理论所束缚，可以相信粗提物量的不同反应了不同属型、产地、园艺种类和制备方法的不同。

实施例3：可可原花青素的部分纯化

A 凝胶渗透色谱

用葡聚糖 LH-20 (28 × 2.5cm)液相色谱对实施例2中得到的原花青素进行部分纯化。分离通过从去离子水到甲醇的梯度进行。最初的梯度液从溶于去离子水的15%甲醇开始,然后每30分钟用溶于去离子水的25%甲醇、溶于去离子水的35%甲醇、溶于去离子水的70%甲醇、最后用100%的甲醇。收集黄嘌呤、生物碱(咖啡因和可可碱)的洗提物作为单一级分,从该级分中分离出无黄嘌呤生物碱的细级分,该细级分进一步分离得到五个细级分,标记为MM2A-MM2E。每一细级分中的溶剂被旋转蒸发器在45℃半真空的条件下蒸发掉,获得的水相部分在液氮中冷冻,然后在LABCONCO冻干系统中过夜进行冻干。图1给出了级分的典型凝胶渗透色谱。用这种方法大致细分离了100mg物质。

图1:粗提原花青素在葡聚糖 LH-20 的凝胶渗透色谱

色谱条件:柱:28 × 2.5cm 葡聚糖 LH-20;流动相:甲醇/水,梯度15:85,25:75,35:65,70:30,100:0,每隔半小时一步;流速:1.5ml/min;检出:UV @ $\lambda_1=254\text{nm}$, $\lambda_2=365\text{nm}$;记录速度:0.5mm/ml;柱载:1120mg。

B. 半制备高效液相色谱 (HPLC)

方法1:反相分离

从实施例2和/或3A中获得的原花青素通过半制备HPLC进行部分分离。惠普(Hewlett Packard)1050HPLC系统装有不同波长的检测器,带有1ml注射环的Rheodyne 7010注射阀和Pharmacia FR AC-100收集器装配在一起。在联有Phenomenex 10 μ ODS Ultracarb保护柱(60 × 10mm)的Phenomenex Ultracarb 10 μ ODS柱(250 × 22.5mm)上进行分离。流动相的组合物是A=水;B=甲醇,应用以下线性梯度:[时间,%A];(0,85), (60,50), (90,0), (110,0),流速为5ml/min。

图15N给出了从级分D+E中分离原花青素的典型半制备HPLC的迹线。每隔一定的时间或手控收集单个峰或所选色谱区域的级分,进行进一步提纯和定性。注射负载范围是25-100mg。

方法2:正相分离

从实施例2和/或3A中获得的原花青素通过半制备HPLC进行部分分离。惠普1050HPLC系统,设置在254nm的480型微孔-水LC检测器

与设置在峰值的 Pharmacia Frac-100 收集器装配在一起。在联有 Supelco 5 μ LC-Si 保护柱 (20 x 4.6mm) 的 Supelco 5 μ Supelcosil LC-Si 柱 (250 x 10mm) 上进行分离。按下列条件用线性梯度洗脱液进行洗脱: (时间, %A, %B); (0, 82, 14), (30, 67.6, 28.4), (60, 46, 50), (65, 10, 86), (70, 10, 86), 随后进行重新平衡 10 分钟。流动相的组合物是 A=二氯甲烷; B=甲醇; C=醋酸: 水 (1: 1), 流速为 3ml/min。用波长为 254nm 的紫外检测, 在 Kipp@Zonan BD41 记录器上记录。注射体积范围是 10mg 的原花青素 100-250 μ l, 该提取物溶于 0.25ml 70% 的丙酮水溶液中。图 15 O 给出了其典型半制备 HPLC 迹线。每隔一定的时间或手控收集单个峰或所选色谱区域的级分, 进行进一步提纯和定性。

HPLC 条件: 250 x 10mm Supelco Supelcosil LC-Si(5 μ m) 半制备柱
20 x 4.6 Supelco Supelcosil LC-Si(5 μ m) 保护柱

检测器: Waters 480 型 LC 分光光度计, 波长 254nm

流速: 3 毫升/分

柱温: 环境温度

进样: 70% 丙酮水溶液提取物 250 μ l。

梯度: 时间 (分)	二氯甲烷	甲醇	醋酸/水(1:1)
0	82	14	4
30	67.6	28.4	4
60	46	50	4
65	10	86	4
70	10	86	4

获得的级分如下:

级分	类型
1	二聚体
2	三聚体
3	四聚体
4	五聚体
5	六聚体
6	七聚体
7	八聚体
8	九聚体
9	十聚体
10	十一聚体
11	十二聚体
12	更高的寡聚体

实施例4: 分析 HPLC 对原花青素提取物的分析

方法1: 反相分离

从实施例3得到的原花青素提取物通过 $0.45\ \mu$ 的滤器进行过滤, 用惠普 1090 三元(ternary)HPLC 系统进行分析, 该系统配有二极管阵列检测器和 1046A 型 HP 程序荧光检测器。用惠普 $5\ \mu$ Hypersil ODS 柱在 $45\ ^\circ\text{C}$ 进行分离。黄酮和原花青素用 60%B-A 的线性梯度洗脱液进行洗脱, 用 B 以 0.3ml/min 的流速洗柱。流动相的组合物是 B=用甲醇配置的 0.5%醋酸, A=用去离子水配置的 0.5%醋酸。A、B 流动相中的醋酸可增到 2%。级分用荧光检测, $\lambda_{\text{ex}}=276\text{nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}}=316\text{nm}$ 。可参照标准溶液确定 (+)-儿茶素和 (-)-表儿茶素的浓度。根据 (-)-表儿茶素的反应指数估计原花青素的水平。图 2A 给出了一种可可属型不同级分分离时的典型 HPLC 色谱。从其它的可可属型中也可得到相似的 HPLC 曲线。

HPLC 条件: 柱: $200 \times 2.1\text{mm}$ 惠普 Hypersil ODS($5\ \mu$)

保护柱: $20 \times 2.1\text{mm}$ 惠普 Hypersil ODS($5\ \mu$)

检测器: 二极管阵列管 280nm

荧光 $\lambda_{\text{ex}}=276\text{nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}}=316\text{nm}$

流速: 0.3ml/min

柱温: 45 °C

梯度: 时间 (分)	去离子水配制的 0.5%醋酸	甲醇配制的 0.5%醋 酸
0	100	0
50	40	60
60	0	100

方法 2: 正相分离

从实施例 2 和/或 3 得到的原花青素提取物通过 0.45 μ 的滤器进行过滤, 用惠普 1090 II HPLC 系统进行分析, 该系统配有二极管阵列检测器和 1046A 型 HP 程序荧光检测器。在联有 Supelco Supelguard LC-Si5 μ 保护柱 (20 x 4.6mm) 的 5 μ Phenomenex Lichrosphere Silica 100 LC-Si 柱 (250 x 3.2mm) 上, 37 °C 时进行分离。按下列条件用线性梯度洗脱液进行洗脱: (时间, %A, %B); (0, 82, 14), (30, 67.6, 28.4), (60, 46, 50), (65, 10, 86), (70k, 10, 86), 随后进行重新平衡 8 分钟。流动相的组合物是 A=二氯甲烷; B=甲醇; C=醋酸: 水 (1: 1), 流速为 0.5ml/min。级分用荧光检测, $\lambda_{ex}=276\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=316\text{nm}$ 或用紫外在 280nm 检测。图 2B 给出了一种可可属型不同原花青素分离时的典型 HPLC 色谱。从其它的可可属型中也可得到相似的 HPLC 曲线。

HPLC 条件: 250 x 3.2mm Phenomenex Lichrosphere Silica 100 柱 (5 μ)

20 x 4.6mm Supelco Supelguard LC-Si (5 μ) 保护柱

检测器: 二极管阵列管 280nm

荧光 $\lambda_{ex}=276\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=316\text{nm}$

流速: 0.5ml/min

柱温: 37 °C

梯度: 时间 (分)	二氯甲烷	甲醇	醋酸/水 (1: 1)
0	82	14	4
30	67.6	28.4	4
60	46	50	4
65	10	86	4
70	10	86	4

实施例 5：原花青素的鉴定

原花青素用交联葡聚糖 LH-20 (28 × 2.5cm)液相色谱进行纯化，随后用 10 μ Bondapak C18(100 × 8mm)柱半制备 HPLC 或 5 μ Supelcosil LC-Si(250 x10mm)柱半制备 HPLC 进行纯化。

特殊纯化的分离物用快速原子撞击-质谱法 (FAB-MS)，在 VG ZAB-T 高分辨 MS 系统中进行分析，该系统在阴阳离子态应用了液态二次离子质谱技术。用铯离子枪在 30KV 作电离源，“魔力子弹基质” (1:1 二硫苏糖醇/二赤藓糖醇) 当作质子源。

用 LSIMS 对这些级分所进行的分析研究揭示出存在一些黄烷-3-酚寡聚物，如表 3 所示。

表 3：可可原花青素级分的 LSIMS (阳离子) 数据

寡聚体	(M+1) ⁺ m/z	(M+Na) ⁺ m/z	分子量
单聚体 (儿茶素)	291	313	290
二聚体	577/579	599/601	576/578
三聚体	865/867	887/889	884/866
四聚体	1155	1177	1154
五聚体	1443	1465	1442
六聚体	1731	1753	1730
七聚体	...	2041	2018
八聚体	...	2329	2306
九聚体	...	2617	2594
十聚体	...	2905	2882
十一聚体	...	...	3170
十二聚体	...	...	3458

主要的质子碎片离子与以前用阴阳离子 FAB-MS 对原花青素所作的分析结果一致 (Self 等, 1986 和 Porter 等,1991)。与 m/z577(M+H)⁺ 相对应的离子和它在 m/z599(M+Na)⁺ 的盐加成物说明在物中有双环原花青素二聚体存在。有趣的是与其说更高的寡聚物组成质子化了的分子离子 (M+H)⁺ 不如说它组成盐加成物 (M+Na)⁺。在 Revila 等 (1991)，Self 等(1986)和 Porter 等(1991)工作的基础上，对原花青素的异构体 B-2，

B-5 和 C-1 进行了尝试性的鉴定。通过 FAB-MS 确定了, 在特殊纯化级分中的原花青素达到八聚体和十聚体。此外, 在 HPLC 正相色谱分析中得到原花青素达到十聚体的证据 (图 2B)。不希望被任何特殊理论所限制, 可以相信十聚体达到在萃取和纯化应用的溶剂中溶解度的极限。表 4 列出了在不含有黄嘌呤生物碱的分离物中发现的原花青素的相对浓度, 这是在反相 HPLC 分析的基础上进行的。

表 4: 不含有黄嘌呤生物碱的分离物中原花青素的相对浓度

级分	分子量	数量
(+)-儿茶素	290	1.6%
(-)-表儿茶素	290	38.2%
B-2 二聚体	578	11.0%
B-5 二聚体	578	5.3%
C-1 三聚体	866	9.3%
双环二聚体	576	3.0%
四聚体	1154	4.5%
五-八聚体	1442 - 2306	24.5%
未知和更高的寡聚体	...	2.6%

表 5: 丙酮水溶液提取物中原花青素的相对浓度

成分	分子重量	数量
(+)-儿茶素和 (-)-表儿茶素	290 (每个均相同)	41.9%
B-2 二聚体和 B-5 二聚体	578	13.9%
三聚体	884/866	11.3%
四聚体	1154	9.9%
五聚体	1442	7.8%
六聚体	1730	5.1%
七聚体	2018	4.2%
八聚体	2306	2.8%
九聚体	2594	1.6%
十聚体	2882	0.7%
十一聚体	3170	0.2%
十二聚体	3458	<0.1%

图3给出了原花青素的几个结构,图4A-4E给出了用于下面抗癌或抗肿瘤活性筛选的五个级分的典型HPLC色谱。以下是图4A-4B的HPLC条件:

HPLC条件:惠普1090三元HPLC系统,配有1064A型HP可编程荧光检测器。柱:惠普5 μ Hypersil ODS(200 $\times$ 2.1mm)

线性梯度 60%B—A,流速 0.3ml/min。B=甲醇配制的0.5%醋酸;A=去离子水配制的醋酸; λ_{ex} =276nm、 λ_{em} =316nm。

图15O给出了用于抗癌或抗肿瘤活性筛选的12个额外级分的典型半制备HPLC色谱(色谱条件如上述)。

实施例6: 可可提取物(原花青素)的抗癌、抗肿瘤或抗赘生物活性

用最初由Mosmann(1983)建立的MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2基)-2,5-二苯基四唑溴化物)-微滴定板四唑细胞毒测定方法来筛选从实施例5获得的试样。试样、标准品(二氨二氯络铂和苯丁酸氮介)和MTT试剂溶于100%的DMSO(二甲基亚砷),配成10mg/ml的浓度。从原液配成系列的稀释液。对于试样,稀释范围为0.01-100 μ g/ml,用0.5%的DMSO配制。

所有的人类肿瘤细胞从美国典型培养物保藏中心获得。细胞在含有10%胎牛血清、100u/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素和240u/ml制霉菌素的 α -MEM培养基中单层培养。细胞在37 $^{\circ}$ C、加湿的、5%CO₂条件下培养。

细胞用胰酶消化后,计数并调细胞浓度为50 $\times 10^5$ /ml(依细胞系不同而异)。把细胞悬液加到96孔板,4排,200 μ l/孔。细胞贴壁4小时后,加含有试样的DMSO 2 μ l,每4个复孔。初始的剂量-反应寻找试验,利用试样稀释度的顺序来确定被检测剂量的范围。用BIO RAD MP450酶标板读数器读出540nm时每孔的吸收值。试样作用的四个复孔的平均值与对照相比,结果表示为:对照吸收值的百分率 $\pm$ 标准差。MTT生成甲赞紫量的减少与每孔活性细胞的数量呈线性关系。因此,通过测定减少的产物的吸收值可获得一定剂量的试样作用时细胞残存的数量百分比。对照孔含有终浓度为1%的DMSO。

用这种方法首先对两种试样进行了检测。试样MM1代表可可原花青素相当粗的分离物,含有大量的咖啡因和生物碱。试样MM2经凝胶渗透色谱部分纯化了的可可原花青素分离物。两种试样都用前面描述的方法筛

选对下列癌细胞系的活性:

HCT 116 结肠癌

ACHN 肾上腺癌

SK-5 黑色素瘤

A498 肾上腺癌

MCF-7 乳腺癌

PC-3 前列腺癌

CAPAN-2 胰腺癌

发现 MM1 对用于研究的癌细胞系没有活性或活性很小。发现 MM2 对 HCT-116、PC-3 和 ACHN 癌细胞系有作用。但是,发现 MM1 和 MM2 都干扰 MTT, 结果阻碍了吸收值的下降, 本来这可以反映细胞存活数目的下降。这种干扰也可导致大量的错误吸收, 因为这种化学反应好象在板孔四周进行的更快一些。图 5 是这种效应的典型例子。原本预料, 试验物质在高浓度时可观测到的细胞存活要大大低于显示出的高存活性。但是, 不管 MTT 的干扰效应, 显微镜检测可证明发生细胞毒效应。例如, 用这种方法可以得到 MM2 作用于 ACHN 细胞系时 $0.5\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值。

根据这些初步结果, 发明人认为应该对测定方案作一些修整, 以排除 MTT 的干扰。这按以下方案完成: 在 37°C 、加湿了的、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养 18 小时以后, 小心地从板中吸出培养液, 补充新鲜的 α -MEM 培养液, 第三天又从板中吸去培养液, 补充 $100\mu\text{l}$ 新鲜的制备好了的 McCoy's 培养基。然后每孔加 $11\mu\text{l}$ 用 PBS (磷酸盐缓冲液) 配制的 5mg/ml MTT 原液。在 37°C 、加湿了的、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养 4 小时以后, 每孔加 0.04N 盐酸异丙醇, 然后充分搅拌以溶解由活细胞产生的甲簪。此外, 决定对原花青素进行细分离, 以确定具有反应活性的特殊成分。

应用前面描述的细分离过程制备样品以进行进一步的筛选。图 1 给出了代表这一部分的五个级分, 图 4A-4E 给出了组分的分布。试样编码为 MM2A-MM2E 以反映它们的分析特性和显示不含有咖啡因和生物碱。

每个级分都单独对 HCT-116、PC-3 和 ACHN 癌细胞系进行了筛选。结果显示活性与任何一个单体成分都无关。因为活性天然产品分离物中的级分可协同作用, 所以这种结果并不认为不平常。在可可原花青素的分离物 (MM2) 中有 12 多种可检测的级分。可以认为活性与存在于不同级分中的级分联合作用相关, 而不是与单体成分相关。

在此基础上, 合并级分, 重复对同一癌细胞的分析。有几个联合成分对 PC-3 癌细胞系产生细胞毒效应。尤其是得到 MM2A 和 MM2E 各 40 μ g/ml 进行合并时的 IC₅₀ 值, 和 MM2C 与 MM2E 各 20 μ g/ml 进行合并时的 IC₅₀ 值。对 HCT-116 和 ACHN 细胞系也报导有活性, 但是, 和前面一样, 由于受到 MTT 指示剂的干扰, 阻碍了精确的研究。为了增加数据, 对 HCT-116 和 ACHN 细胞系重复了同样的试验, 但是, 由于细菌污染及用完了试样, 没有得到结果。图 6A-6D 可可提取物的联合与 PC-3 癌细胞的剂量-反应关系。

不过, 从这些数据可清楚的看到, 可可提取物尤其是可可多酚或原花青素有明显的抗肿瘤、抗癌或抗赘生物作用, 尤其对于人类 PC-3 (前列腺)、HCT-116 (结肠) 和 ACHN (肾) 癌细胞系。此外, 这些结果提示特异的原花青素级分或许是对抗 PC-3 细胞系的活性成分。

实施例 7: 可可提取物 (原花青素) 的抗癌、抗肿瘤或抗赘生物活性

为了证明上述结果及进一步探讨级分组合物, 进行了另外的综合性筛选。

除每一实验剂量由通常 4 个复孔增至 8 或 12 个复孔之外, 所有制备的物质和过程与前面报导的一致。这次研究中, 五个可可原花青素级分单独或联合使用, 对下列癌细胞系的对抗作用进行了筛选。

PC-3 前列腺

KB 鼻咽/宫颈癌

HCT-116 结肠

ACHN 肾

MCF-7 乳腺

SK-5 黑色素瘤

A-549 肺

CCRF-CEM T-细胞白血病

单独筛选包括分析级分 A、B、C、D、E (见图 4A-4E 及其讨论, 同上) 对抗每一细胞系的不同剂量水平。联合筛选包括结合的等剂量水平的级分 A+B, A+C, A+D, A+E, B+C, B+D, B+E, C+D, C+E 和 D+E 对抗每一细胞系。对这些测定结果单独进行讨论, 随后进行全面的总结。

A. PC-3 前列腺细胞系

图 7A-7H 给出了可可原花青素级分和 PC-3 细胞系的典型剂量反应关系。图 7D-7E 证明级分 D 和 E 在 $75\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值下具有活性。当级分 D 和 E 存在时,从其它原花青素级分联合应用得到的剂量反应曲线上得到的 IC_{50} 值的范围为 $60\text{-}80\mu\text{g/ml}$ 。表 6 列出了单独的 IC_{50} 值。

B. KB 鼻咽/宫颈癌细胞系

图 8A-8H 给出了可可原花青素级分和 KB 鼻咽/宫颈癌细胞系的典型剂量反应关系。图 8D-8E 证明级分 D 和 E 在 $75\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值下具有活性。图 8F-8H 描记了联合研究时获得的典型结果。在此过程中,原花青素 A+B 的联合无效,而 B+E 和 D+E 在 $60\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值下有效。当级分 D 和 E 存在时,从其它级分联合应用得到的剂量反应曲线上得到的 IC_{50} 值的范围为 $60\text{-}80\mu\text{g/ml}$ 。表 6 列出了单独的 IC_{50} 值。这些结果基本上与对抗 PC-3 细胞系时的一致。

C. HCT-116 结肠细胞系

图 9A-9H 给出了可可原花青素级分和 HCT-116 结肠细胞系的典型剂量反应关系。图 9D-9E 证明级分 E 在接近 $400\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值具有活性。该值是通过存在的曲线进行推测而得到的。应注意到级分 D 剂量反应曲线的斜度也显示出活性。但是,由于曲线坡度太缓以致于从图上确定不出 IC_{50} 值。图 9F-9H 描记了联合研究时获得的典型结果。在此过程中,原花青素 B+D 的联合无显效,而 A+E 和 D+E 在 $500\mu\text{g/ml}$ 和 $85\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值有效。当 E 存在时,从其它级分联合应用得到的剂量反应曲线上得到的 IC_{50} 值平均在 $250\mu\text{g/ml}$ 。表 6 列出了推测的 IC_{50} 值。

D. ACHN 肾细胞系

图 10A-10H 给出了可可原花青素级分和 ACHN 肾细胞系的典型剂量反应关系。图 10A-10E 说明对这一细胞系单独级分无效。图 10F-10H 描记了联合研究时获得的典型结果。在此过程中,原花青素 B+C 的联合无显效,而 A+E 在接近 $500\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值有效。因为曲线的坡度太缓,所以认为与 C+D 联合应用得到的剂量反应曲线相似地无效。表 6 列出了其它级分联合应用时推测的 IC_{50} 值。

E. A-549 肺细胞系

图 11A-11H 给出了可可原花青素级分和 A-549 肺细胞系的典型剂量反应关系。在本测定中所应用的剂量范围内,没检测到任何有活性的单体级

分或组合级分。但是原花青素也许尤对这一细胞系有效。

F.SK-5 黑色素瘤细胞系

图 12A-12H 给出了可可原花青素级分和 SK-5 黑色素瘤细胞系的典型剂量反应关系。在本测定中所应用的剂量范围内, 没检测到任何有活性的单体级分或组合级分。但是原花青素也许对这一细胞系有效。

G.MCF-7 乳腺细胞系

图 13A-13H 给出了可可原花青素级分和 MCF-7 乳腺细胞系的典型剂量反应关系。在本测定中所应用的剂量范围内, 没检测到任何有活性的单体级分或组合级分。但是原花青素也许对这一细胞系有效。

H.CCRF-CEM T-细胞 白血病系

本来由对抗 CCRF-CEM T-细胞白血病系得到的典型剂量反应曲线, 但是, 不同浓度时显微镜下的细胞数对时间显示出, 经过 4 天, 500 μ g 的 A、B 和 D 能引起 80% 的生长下降。图 14 给出了典型的剂量反应关系。

I 小结

除 CCRF-CEM T-细胞白血病外, 用这些分析方法得到的所有细胞系的 IC₅₀ 值均收集在表 6 中, 由于应用了不同的分析方法, 所以计划从表中删除 T-细胞白血病的数据。大致而言, 这些结果说明活性最高的部分与级分 D 和 E 有关。这些级分对 PC-3 (前列腺) 和 KB (鼻咽/宫颈癌) 细胞系的活性最高。也证明这些级分对 HCT-116 (结肠) 和 ACHN (肾) 有效, 但是仅仅在非常高的剂量时, 对 MCF-7 (乳腺)、SK-5 (黑色素瘤)、和 A-549 (肺) 细胞系无效。但是, 原花青素级分也许仍对这些细胞系有作用。对 CCRF-CEM (T-细胞白血病) 细胞系也显示出活性。同样也应该指出的是 D 和 E 在组合上是最复杂的。然而, 从这些数据可清楚的看到, 可可提取物尤其是可可原花青素有明显的抗肿瘤、抗癌或抗赘生物作用。

表 6: 可可原花青素级分对不同细胞系的 IC₅₀ 值
(在 µg/ml 的 IC₅₀ 值)

级分	PC-3	KB	HCT-116	ACHN	MCF-7	SK-5	A-549
A							
B							
C							
D	90	80					
E	75	75	400				
A+B							
A+C	125	100					
A+D	75	75					
A+E	80	75	500	500			
B+C							
B+D	75	80					
B+E	60	65	200				
C+D	80	75		1000			
C+E	80	70	250				
D+E	80	60	85				

超过 100 µg/ml 的值通过剂量反应曲线进行推测

实施例 8 可可提取物（原花青素）的抗癌、抗肿瘤或抗赘生物活性

应用几个附加的体外分析方法对例 6 和 7 中的结果进行补充和扩充。

方法 A 结晶紫染色方法

所有的人类肿瘤细胞均来自美国典型培养物保藏中心。细胞在含有 10% 胎牛血清无抗菌素的 IMEM 中，以单层细胞生长，在加湿的、5% CO₂、37 °C 下进行培养。

胰酶消化后，计数，调细胞浓度为 1000 – 2000/100 µl。铺细胞到 96 孔板（1000-2000 细胞/孔）测定细胞增殖。每孔加 100 µl 的细胞后，贴壁 24 小时，24 小时结束之前，加入不同浓度的不同可可提取物，以获取剂量反应结果。

用培养液把可可提取物配成 2 倍浓度，每种溶液加 100 µl，每三个复

孔。连续几天以后,用 50 μ l 结晶紫染色,作用 15 分钟(2.5 克结晶紫溶于 125ml 甲醇, 375ml 水中),然后移去染剂,把板轻轻浸入冷水中以除去过剩的染剂。这样重复洗涤 2 次,把板晾干。每孔加入

100ml 的 0.1M 柠檬酸盐/50%甲醇 100 μ l,以溶解残留的染料。溶解以后,用 ELISA 酶标仪在 540nm 处(410nm 作为参照)对细胞数进行定量。以 Y 轴为吸收值, X 轴为生长天数,把从 ELISA 酶标仪获得的结果制图。

方法 B 软琼脂克隆测定法

参照 Nawata 等(1981)的方法,在软琼脂上对细胞进行克隆。在含有 0.8%软琼脂和不同浓度可可成分的培养基中制备单个细胞悬液,悬液等分到覆盖到 0.1%琼脂的 35mm 平皿中,培养 10 天后,在 Ominicron 3600 成象分析系统上检测直径大于 60 μ m 的集落数,以集落数为 Y 轴,可可成分的不同浓度为 X 轴,对结果制图。

方法 C: XTT——微型培养四唑测定法

用 Scudiero 等(1988)所描述的 XTT 测定法来筛选各种可可成分。除了下面的调整以外,这种方法基本上与 MTT 的过程一样。XTT(2,3-二(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-5-((苯基氨基)羰基)-2H-四唑氢氧化物)在不含血清,预热到 37 $^{\circ}$ C 的培养基中配制,浓度为 1mg/ml。PMS 在 5mMPBS 中配制。XTT 与 PMS 混合, 10 μ L PBS/ml XTT, 每孔加 50 μ L PMS-XTT。在 37 $^{\circ}$ C 培养 4 小时后,在机械振荡器上混合 30 分钟,然后,在 450-600nm 处测定吸收值。所得结果以吸收值为 Y 轴,生长天数或浓度为 X 轴,制成图表。

方法 A 和方法 C 中,所得结果均以百分率对照为 Y 轴,生长天数或浓度为 X 轴进行制图,制成图表。

用可可级分 D&E(实施例 3B)对抗乳腺癌细胞系 MCF-TP168 的实验对 XTT 和结晶紫两种方法进行了比较,以找到最敏感的方法。如图 15A 所示,在浓度 275 μ g/ μ L 时,两种方法显示出同样的剂量反应关系。在浓度低于此值时,结晶紫测定方法的标准差高于 XTT 测定法。但是,由于结晶紫测定方法易于应用,所以,除个别特殊的外,以后的测定方法均用此法。

给出的结晶紫测定结果(图 15B-15E)证明了多酚粗提物(实施例 2)

分别对乳腺癌细胞系 MDA MB231, 前列腺癌细胞系 PC-3, 乳腺癌细胞系 MCF-7 p168, 宫颈癌细胞系 Hela 有效。在所有的情况下 250 μ g/ml 的剂量可完全抑制经过 5-7 天培养的所有癌细胞的生长。

因为 100 μ g/ml 时已经抑制了 Hela 细胞的生长, 所以 Hela 细胞系对提取物似乎更敏感。对实施例 3B 中得到的可可级分对 Hela 和另外一个乳腺癌细胞系 SKBR_3 的活性也进行了检测。结果 (图 15F 和 15G) 显示 D&E 级分活性最高。如图 15H 和 15I 所示, 从两种癌细胞系均获得 D&E 40 μ g/ml 时的 IC_{50} 值。

也用软琼脂克隆测定法的对 D&E 级分进行了检测, 以确定受试化合物锚基(anchorage)非依赖生长的能力。如图 15J 所示, 100 μ g/ml 的浓度完全抑制了 Hela 细胞集落的形成。

代表可可三个园艺种类的八种不同属型中得到的多酚粗提物对 Hela 细胞系的作用也进行了检测。如图 15K 所示, 可可所有的不同产物都具有相似的剂量-反应效果。对于 Hela 细胞系, UIT-1 种的活性最高。这些结果证明, 所有的可可属型具有多酚级分, 该级分至少诱导对人的癌细胞系产生抵抗活性, 而不依赖于产地, 园艺种类和属型。

另外, 对从一吨传统的经五天发酵, 然后经四天太阳晒干的巴西可可豆中制备的多酚粗提物进行了系列分析。图 15L 中的结果显示, 这些早期的处理过程没有明显效果, 提示多酚组合物发生了少许变化。但是, 已知 (Lehrian 和 Patterson, 1983) 在酵解过程中, 多酚氧化酶 (PPO) 会氧化多酚。为了确定出哪种经酶氧化的多酚具有活性, 又进行了另外的实验。粗 PPO 的制备方法是, 用丙酮以 1gm 粉末/10ml 丙酮的比例, 从未发酵、冻干、脱脂、粉碎成细末的巴西可可豆中提取。在 3000rpm 下把浆液离心 15 分钟, 这样重复 3 次, 每次都弃去上清液, 第四次的萃取物用 Buchner 过滤漏斗过滤。丙酮粉末在空气中干燥, 然后依照 McLord 和 Kilara (1983) 描述的方法进行测定。100mg 的粉末 (400 μ g/mg 蛋白质) 加入到粗多酚的溶剂中 (100mg/10ml 柠檬酸-磷酸盐缓冲液, 0.02M, PH5.5), 然后将空气鼓入浆液进行搅拌 30Min。样品在 5000 $\times$ g 离心 15Min, 用 20ml 乙酸乙酯萃取到 3 $\times$ 。合并乙酸乙酯的萃取物, 用半真空蒸馏进行干燥, 加入 5ml 水然后进行冷冻。接着, 测定该物质对 Hela 细胞的作用, 所得的剂量-反应曲线与未经酶处理的多酚粗提物的进行比较。结果 (图 15M) 显示经酶氧化提取物的剂量-反应曲线发生了明

显的转移，表明氧化产物比其原本形式具有更高的抑制活性。

实施例 9：含有原花青素可可提取物的抗氧化剂活性

文献中的论述提示了天然存在的抗氧化剂（维生素 C、E 和 β -胡萝卜素）的消费和低发病率的关系，所述疾病包括癌症在内（Designing Foods, 1993; Caragay, 1992）。通常认为这些抗氧化剂影响参与某些涉及肿瘤促进因素的氧化与自由基过程。此外，一些具有抗致癌的植物多酚化合物也具有基本的抗氧化活性（Ho 等, 1992; Huang 等, 1992）。

为了检测含原花青素的可可提取物是否具有抗氧化特性，应用了标准的 Rancimat 法。用实施例 1、2、3 中描述的方法制备可可提取物，进一步通过凝胶渗透色谱分离出两种级分。这两种级分实际上是 A 至 C，D 和 E 的组合（见图 1），它们的抗氧化剂特性与合成的抗氧化剂 BHA 和 BHT 被进行了比较。

从去皮后、未发酵的花生中可压出花生油。将每种受试化合物滴到油中，达到两个浓度水平 - 100ppm 和 20ppm，表 7 给出了实际浓度水平，每种样品中加入 50 μ l 甲醇溶解的抗氧化剂，以帮助抗氧化剂分散。不含抗氧化剂的 50 μ l 作对照。

采取 Rancimat 稳定性实验，在 100 °C 和 20cc/min 空气的条件下，用双份样品测定其氧化稳定性。选择实验特色与活性氧方法（AOM）或快速稳定性实验进行比较（Van Oosten 等, 1981）。图 16 给出了典型的 Rancimat 曲线。表 8 报告了结果，该结果的时间是要求过氧化物达到 100meq 时的时间。

表 7：抗氧化剂的浓度

样品	水平 1	水平 2
	ppm	
丁基化羟基甲苯 (BHT)	24	120
丁基化羟基茴香醚 (BHA)	24	120
可可的粗乙酸乙酯级分	22	110
级分 A - C	20	100
级分 D - E	20	100

表 8：含不同抗氧化剂的花生油的氧化稳定性

样品	200ppm 100ppm	
	平均值	
对照	10.5±0.7	
BHT	16.5±2.1	12.5±2.1
BHA	13.5±2.1	14.0±1.4
可可的粗级分	18.0±0.0	19.0±1.4
级分 A - C	16.0±6.4	17.5±0.0
级分 D - E	14.0±1.4	12.5±0.7

该结果表明，含所有受试添加剂的花生油氧化稳定性提高了。加入乙酸乙酯粗提物的样品氧化稳定性提高得最高。这些结果证明含有原花青素的可可提取物，其抗氧化剂能力与等量的合成 BHT 和 BHA 相等，或高于它。因此，本发明可应用于 BHT 或 BHA 已知应用的领域中，如作为抗氧化剂或食物添加剂。并且，在这一点上，还需要指出的是本发明源于可食之物。给出这些结果后，技术人员不经实验可容易地确定出本发明在应用 BHT 或 BHA 场合中的合适用量，例如，加到食品中的量。

实施例 10：拓扑异构酶 II 的抑制研究

DNA 拓扑异构酶 I 和 II 是催化 DNA 螺旋打开或连接的酶，由此可控制 DNA 的拓扑状态 (Wang, 1985)。除了对拓扑异构酶细胞内功能的研究以外，已确定出的最显著的发现之一是，拓扑异构酶是一些临床上主要抗肿瘤化合物的初始细胞内的靶 (Yamashita 等, 1990)，这些抗肿瘤化合物包括嵌合剂 (intercalating agent, 如 m-AMSM、阿霉素和椭圆玫瑰树) 以及非嵌合剂表鬼白毒素。一些证据表明一些抗肿瘤药物具有相同的稳定 DNA--拓扑异构酶 II 复合体 (可分裂复合体) 的特性，当复合体遇到变性剂时可导致 DNA 的分裂 (Muller 等, 1989)。这也暗示了由抗肿瘤药物诱导产生的可分裂复合体，可产生松弛 DNA 的加成物从而导致细胞死亡。

依照这一吸引人的模式，特异的新 DNA 拓扑异构酶 II 可分裂性复

合体诱导物可用作抗癌、抗肿瘤或抗赘生物剂。为了确定具有以 DNA 作靶活性的细胞毒性化合物,对几种 DNA--损坏敏感细胞系的细胞毒活性具有增强作用的可可原花青素进行了筛选,并用从人的淋巴瘤获得的拓扑异构酶 II 进行酶测定。

A 拓扑异构酶 II 对动核 DNA 的解链

按 Muller 的方法 (1989),进行了体外抑制拓扑异构酶 II 对动核 DNA 的解链实验。按 Muller 等 (1981) 和 Danks 等 (1988) 的方法,略加调整,从人的淋巴瘤制备出含活性拓扑异构酶 II 的核提取物。34℃,作用 30Min, 1 单位的纯化酶就足以对 0.25μg 的动核 DNA 进行解链。动核 DNA 从 *Crithidia fasciculata* 锥虫中获得。每个反应在 0.5ml 微离心管中进行,管中含有 19.5μl H₂O, 2.5μl 10 × 缓冲液 (1 × 缓冲液含有 50mM Tris_HCl, PH8.0, 120mM KCL, 10mM MgCl₂, 0.5mM ATP, 0.5mM 二硫苏糖醇和 30μg BSA/ml), 1μl 动核 DNA (0.2μg), 和 1μl 含有相同浓度可可原花青素受试级分的 DMSO。充分混合这些物质并放置在冰上。在进行 34℃ 水浴培养之前立即加入 1 单位的拓扑异构酶,作用 30 分钟。

培养以后,加入 5μl 中止缓冲液 (5% sarkosyl, 0.0025% 溴酚兰, 25% 甘油) 中止反应,并放于冰上。在用含溴化乙锭 (0.5μg/ml) 的 TAE 配制的 1% 琼脂糖胶上进行电泳。紫外灯在 310nm 处照明可看到 DNA。用 Polaroid Land 照相机对凝胶照相。

图 17 给出了这些实验结果。全部解链的动核 DNA 不移进 1% 琼脂糖胶。由拓扑异构酶 II 解链的 DNA 一般形成单聚 DNA (单环, I 和 II) 带,这些带一定移进胶里。随浓度的升高,单体带逐渐消失,由此可看出添加剂可可原花青素对酶的抑制作用。基于这些实验,可可原花青素的成分 A、B、D、E 在 0.5 — 5.0μg/ml 这一浓度范围可抑制拓扑异构酶 II。这些抑制浓度与 mitoxanthrone 和 m-AMSA (4'-(9-吡啶基氨基)甲磺基-间-甲氧基苯酰碘胺) 非常相似。

B 药物敏感细胞系

用几种 DNA 损害敏感细胞系对可可原花青素的细胞毒活性进行了筛选。其中一个细胞系是 P.Jeggo(Kemp 等, 1984)建立的 xrs-6 DNA 双股螺旋断裂修补突变株, xrs-6 细胞系的 DNA 修补缺陷株对 X-射线非常敏感,对直接导致 DNA 双股螺旋断裂的化合物,如争光霉素非常敏感,对拓扑异构酶 II 的抑制物非常敏感,这样可象 Waters(1991)指出的那样直接

导致双股螺旋的断裂。对修补缺陷细胞系的细胞毒活性与对修补完全的 CHO 系, BR1 的细胞毒活性进行了比较, DNA 可分裂双股螺旋断裂的形成, 作为依据解释了对修补缺陷细胞系 xrs-6 细胞毒活性的增强。

DNA 修补感受态 CHO 系 - BR1 - 是由 Barrows 等 (1987) 建立的, 除表达正常的 CHO DNA 修补酶外, 还表达 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶。CHO 双股螺旋断裂修补缺陷株 (xrs-6) 是 Dr.P.Jeggo 和合作者 (Jeggo 等, 1989) 的慷慨礼品。两种细胞系均以单层生长在实施例 6 描述的含血清和抗生素的 α -MEM 中, 细胞在 37 °C、加湿的含 5%CO₂ 的空气中培养。在可可原花青素处理以前, 用胰蛋白酶消化。用实施例 6 中的 MTT 法进行测定。

结果 (图 18) 显示出对 xrs-6 细胞的细胞毒作用无增强, 提示可可原花青素抑制拓扑异构酶 II 的方式与可分裂双股螺旋断裂形成不同。也就是说, 可可原花青素在拓扑异构酶 II 与 DNA 相互作用之前就和它产生了相互作用, 从而形成非可分裂复合体。

非可分裂复合体是相对新的发现。蒽环型药、鬼臼树脂生物碱、蒽双酮、吡啶和 ellipticines 都是临床应用的抗癌、抗肿瘤或抗赘生物剂, 它们都形成可分裂复合体 (Lin1989)。最近确定出几种新的拓扑异构酶 II 抑制剂并不产生可分裂复合体。它们包括 amonafide (Hsiang 等 1989), 偏端霉素 (Fesen 等, 1989), 黄烷类 (Yamashit 等, 1990), saintopin (Yamashirt 等, 1991), membranone (Drake 等, 1989), 萜类化合物 (Kawada 等, 1991), anthrapyrazoles (Fry 等, 1985), 二氧代哌嗪 (Tanabe 等, 1991) 和 marine acridine - dercitin (Burres 等, 1989)。

因为可可原花青素在可分裂复合体形成以前已抑制了拓扑异构酶 II 的活性。所以不论单独应用还是与其它作用机制已明确的拓扑异构酶 II 抑制剂联合应用, 可可原花青素都具有化疗价值。此外, 可可原花青素也可作为一种新的拓扑异构酶 II 抑制物 (Kashiwata 等, 1993), 其细胞毒性比其它已知的抑制物要低, 从而可增强它在化疗中的作用。

人类乳腺癌细胞系 MCF-7 (ADR) 表达一种膜结合蛋白, 从而授予细胞多药抵抗性 (Lenonessa 等, 1994) 和它的亲本系 MCF-Tp168 用于分析级分 D&E 的效果。如图 19 所示, 随 D&E 浓度逐渐升高, 亲本系受到抑制而阿霉素 (ADR) 抵抗系在较高浓度时几乎不受影响。这些结果显示 D&E 对多药抵抗性细胞系有效。

实施例 11: 原花青素的合成

依照 Delcour 等 (1983) 建立的方法加以调整来合成原花青素。除了在减压条件下用二氢懈皮酮缩合的 (+)-儿茶素外, (-)-表儿茶素也常用于反映未发酵可可豆中天然存在的 (-)-表儿茶素的高浓度。用例 3、4、5 中的方法对合成产物进行分离、纯化、分析和鉴定。用这种方法制备的二黄烷类、三黄烷类、四黄烷类在与上述可可提取物有关的情况下可用作分析标准。

实施例 12: 正相半制备级分的鉴定

既然多酚提取物在组成上是复合物, 所以有必要确定哪种成分在抗癌细胞时具有活性, 以进一步进行纯化、剂量-反应测定和综合结构鉴定。正相半制备 HPLC 分离 (实施例 3B) 可用于分离寡聚体大小的可可原花青素。除了最初的提取物, 又制备出 12 个级分 (图 2B-15O), 在 100 μ g/ml 和 25 μ g/ml 两个浓度测定其对 Hela 细胞的作用, 以确定哪种寡聚体具有最高的活性。如图 20 所示, 级分 4-11 (5 聚体-12 聚体) 表明接近 25 μ g/ml 时的 IC₅₀ 值。结果表明这些特殊的寡聚体对 Hela 细胞的活性最高。另外, 可可成分 D&E 的正相 HPLC 分析结果显示这一成分富含这些寡聚体。从以上可以看出, 本发明的提取物、可可多酚及合成方法和试剂盒具有实用价值。在这一点上, 要提出本发明源于食物, 体外的活性至少可证明体内的一些活性, 尤其就上述的剂量而言。

此外, 上面的论述表明本发明的提取物、可可多酚及合成方法和试剂盒具有和 BHT、BHA 相似的抗氧化剂活性及氧化稳定性。因此, 本发明可在 BHT、BHA 已知的应用领域代替它们, 象作为抗氧化剂, 如抗食物氧化的添加剂。本发明也可在拓扑异构酶抑制物现知的应用领域代替它。由此本发明设想出许多化合物和方法; 例如, 抗氧化剂或防腐剂, 拓扑异构酶抑制物, 保存食物的方法或希望的目的如防氧化和抑制拓扑异构酶的方法, 既可包括提取物和/或可可多酚, 又可包括用各个化合物或提取物和/或可可多酚与食物、目的物或拓扑异构酶接触。

通过详细论述本发明的优选实施方案, 应该理解, 由所附权利要求限定的发明不能被上述说明的具体细节所限制, 因为在与本发明的精神或范围不相违背的情况下可能有许多表面上的变动。

参考文献

1. Barrows, L.R., Borchers, A.H.和 Paxton, M.B., 与 O⁶-鸟嘌呤烷基化不同, 表达 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转染酶的转染 CHO 细胞对 DNA 损害的抵抗增加, *Carcinogenesis*, 8:1853(1987)。

2. Boukharta, M., Jalbert, G.和 Castonguay, A., 鞣花丹宁和鞣花酸作为癌症化学预防剂的效力, 第十六届多酚类国际会议, 里斯本, 葡萄牙, 1992年7月13-16日。

3. Burres, N.S., Sazesh, J., Gunawardana, G.P.和 Clement, J.J., 一种从海生 *Dercitus* 海绵分离出的新吡啶生物碱-Dercitin 的抗癌活性和核酸结合蛋白, *癌症研究*, 49,5267-5274 (1989)。

4. Caragay, A.B., 预防癌症的食物及成分, *食物技术*, 46:4, 65-79(1992)。

5. Chu, S.-C., Hsieh, Y.-S.和 Lim, J.-Y., 黄烷类对 Maloney 鼠白血病病毒逆转录酶活性的抑制作用, *天然产品杂志*, 55:2, 179-183(1992)。

6. Clapperton, J., Hammerstone, J.F. Jr., Romanczyk, L.J.Jr., Chan, J., Yow, S., Lim, D.和 Lockwood, R., 多酚和可可味, 第十六届多酚类国际会议, 里斯本, 葡萄牙, 1992年7月13-16日。

7. Danks, M.k., Schmidt, C.A., Cirtain, M.C., Suttle, D.P.和 Beck, W.T., VM-26 抵抗的人白血病细胞中获得的拓扑异构酶 II 改变催化活性和 DNA 分裂, *Biochem.*, 27:8861(1991)。

8. Delcour, J.A., Ferreira, D. 和 Roux, D.G., 缩合丹宁的合成, 第9部分, 用 (+)-儿茶素和已获得的原花青素缩合无色花青素的过程, *J.Chem.Soc.Perkin Trans. I*, 1711-1717 (1983)。

9. Deschner, E.E., Rupereto, J., Wong, G.和 Newmark, H.L., 氧化偶氮甲醇抑制物槲皮苷和芦丁—导致结肠肿瘤, *Carcinogenesis*, 7, 1193-1196(1991)。

10. 设计食品、加工食品以增进健康, *Inform*, 4:4, 344-369(1993)。

11. Drake, F.H., Hofmann, G.A., Mong, S.-M., Bartus, J.O., Hertzberg, R.P., Johnson, R.K., Mattern, M.R.和 Mirabelli, C.K., 抗癌剂 Membranoe 体外及细胞内对拓扑异构酶 II 的抑制作用, *癌症研究*, 49, 2578-2583(1989)。

12. Engels J.M.M., 可可的基因资源: CATIE 收集品的分类,

Tech.Bull. Turrialba, Cost Rica(1981).

13. Enriquez G.A.和 Soria J.V., 可可栽培品种登记 IICA, Turrialba, Cost Rica(1967).

14. Ferreira, D., Steynberg, J.P., Roux, D.G.和 Brandt, E.V., 寡聚黄烷类结构和功能的多样性, Tetrahedron, 48:10, 1743-1803(1992).

15. Fesen, M.和 Pommier, Y., 哺乳动物的拓扑异构酶 II 活性被 DNA 小沟结合物—Simian 病毒 40DNA 中 Distainycin 所修饰, 生化杂志, 264, 11354-11359(1989).

16. Fry, D.W., Boritzki, T.J., Besserer, J.A.和 Jackson, R.C., 蒽环[1, 9-CD]吡唑-6 (2H) -酮 (蒽环吡唑), Biochem. Pharmacol., 34, 3499-3508(1985).

17. Hsiang, Y.-H., Jiang, J.B.和 Liu, L.F., 拓扑异构酶 II 介导由 Amonafide 和其结果类似物引起的 DNA 分裂, Mol. Pharmacol., 36, 372-376(1989).

18. Jalal, M.A.F.和 Collin, H.A., 成熟植物的多酚, *Theobroma Cacao* 种子和组织培养, 植物化学, 6, 1377-1380(1978).

19. Jeggo, P.A., Caldecott, K., Pidsley, S.和 Banks, G.R., DNA 双股螺旋断裂修补缺陷的中国仓鼠卵巢突变种对拓扑异构酶 II 抑制物敏感, 癌症研究, 49:7057(1989).

20. Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., Lee, K.J.-H., Bori, I., Fukushima, Y., Bastow, K.F.和 Lee, K.-H., 丹宁 DNA 拓扑异构酶 II 体外的有效抑制物, J.Pharm.Sci., 82:5, 487-492(1993).

21. Kato, R., Nakadate, T., Yamamoto, S.和 Sugimura, T., 槲皮苷对 12-O-十四酰佛波醇-13-醋酸盐促肿瘤作用和鸟氨酸脱羧酶活性的抑制: 可能包括脂氧合酶的抑制, 致癌作用, 4, 1301 - 1305(1983).

22. Kawada, S.-Z., Yamashita, Y., Fujii, N.和 Nakano, H., 非嵌合 Terpenoids、Terpentecin 和 Clerocidin 诱导的热稳定拓扑异构酶 II—DNA 可分裂复合体, 癌症研究, 51, 2922-2929(1991).

23. Kemp, L.M., Sedgwick, D.H.和 Jeggo, P.A., DNA 双股螺旋断裂联接缺陷的中国仓鼠卵巢细胞的敏感突变种, 突变研究(Mutat. Res.), 132:189(1984).

24. Kikkoman Corporation, 抗突变剂含有原花青素寡聚体, 优选含有

黄烷-三酚-二醇结构, 日本 04190774-A, 1992 年 7 月 7 日。

25. Lehrian, D.W.; Tatterson, G.R., 生物技术; Reed, G., Ed.; Verlag Chemie : Weinheim, 1983, Vol.5, chapter 12 .

26. Leonessa, F., Jacobson, M., Boyle, B., Lippman, J., McGarvey, M. 和 Clarke, R., Tamoxifen 对人类乳腺癌细胞多药抗性表型的影响: 异辐射测量器, 药物积累和结合 Mr170,000 糖蛋白(gp170)的研究, 癌症研究, 54, 441-447(1994)。

27. Liu, L.F., DNA 拓扑异构酶作为抗肿瘤药物的毒性, 生化综述年刊 (Ann. Rev. Biochem.), 58, 351-375(1989)。

28. McCord, J.D.和 Kilara A., 已加工蕈类(蘑菇)酶褐化的控制, 食品科学杂志, 48:1479(1983)。

29. Miller, K.G., Liu, L.F.和 Englund, P.A., 从 Hela 细胞核获得的同型 DNA 拓扑异构酶 II, 生化杂志, 256:9334(1981)。

30. Mosmann, T., 细胞生长和残存的快速染色测定法: 增殖和细胞度测定方法, 免疫学方法杂志, 65, 55(1983)。

31. Muller, M.T., Helal, K., Soisson, S.和 Spitzer, J.R., 真核细胞拓扑异构酶 II 的快速、定量微滴度测定法, 核酸研究, 17:9499(1989)。

32. Nawata, H., Chong, M.T., Bronzeret, D.和 Lippman, M.E., 人类乳腺癌细胞系 MCF-7 子系的雌二醇非依赖生长, 生化杂志, 256:13, 6895-6902(1981)。

33. Okuda, T., Yoshida, T.和 Hatano, T., 多酚的分子结构和药理学活性-寡聚可水解丹宁和其它, 第十六届多酚类国际会议, 里斯本, 葡萄牙, 1992 年 7 月 13 - 16 日。

34. 食物中的酚化合物和它们对健康的影响 II: 抗氧化剂和癌症预防, Huang, M.-T., Ho, C.-T.和 Lee, C.Y.编, ACS Symposium Series 507, 美国化学协会, Washington, D.C.(1992)。

35. 食物中的酚化合物和它们对健康的影响 I: 分析, 存在和化学, Huang, M.-T., Ho, C.-T.和 Lee, C.Y.编, ACS Symposium Series 507, 美国化学协会, Washington, D.C.(1992)。

36. Porter, L.J., Ma, Z.和 Chan, B.G., 可可原花青素: 主要黄烷类和一些次要代谢产物的鉴定, 植物化学, 30, 1657-1663(1991)。

37. Revilla, E., Bourzeix, M. 和 Alonso, E., 用配有图象二极管阵列检

测器的 HPLC 鉴定葡萄种子中儿茶素和原花青素, 色谱(Chromatographia), 31, 465-468(1991)。

38. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H. Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D.和 Boyd, M.R., 可溶性四氮唑盐/甲斐测定法对人类和其他肿瘤细胞系生长和药物敏感性的判断, Canur Research, 48,4827-4833(1988)。

39. Self, R., Eagles, J., Galetti, G.C., Mueller-Harvey, I., Hartley, R.D., Lee, A.G.H., Magnolato, D., Richli, U., Gujur, R.和 Haslam, E., 多酚的快速原子撞击质谱(合成植物丹宁), 生物医学环境.质谱(Biomed Environ.Mass Spec.), 13, 449-468(1986)。

40. Tanabe, k., Ikegami, Y., Tshda, R.和 Andoh,T., 抗癌剂 2 (2 , 6 - 二氧代哌啶衍生物) 对拓扑异构酶 II 的抑制, 癌症研究, 51, 4903-4908(1991)。

41. Van Oosten, C.W., Poot, C.和 A.C.Hensen, 快速稳定性实验的准确性, Fette, Seifen, Anstrichmittel, 83:4, 133-135(1981)。

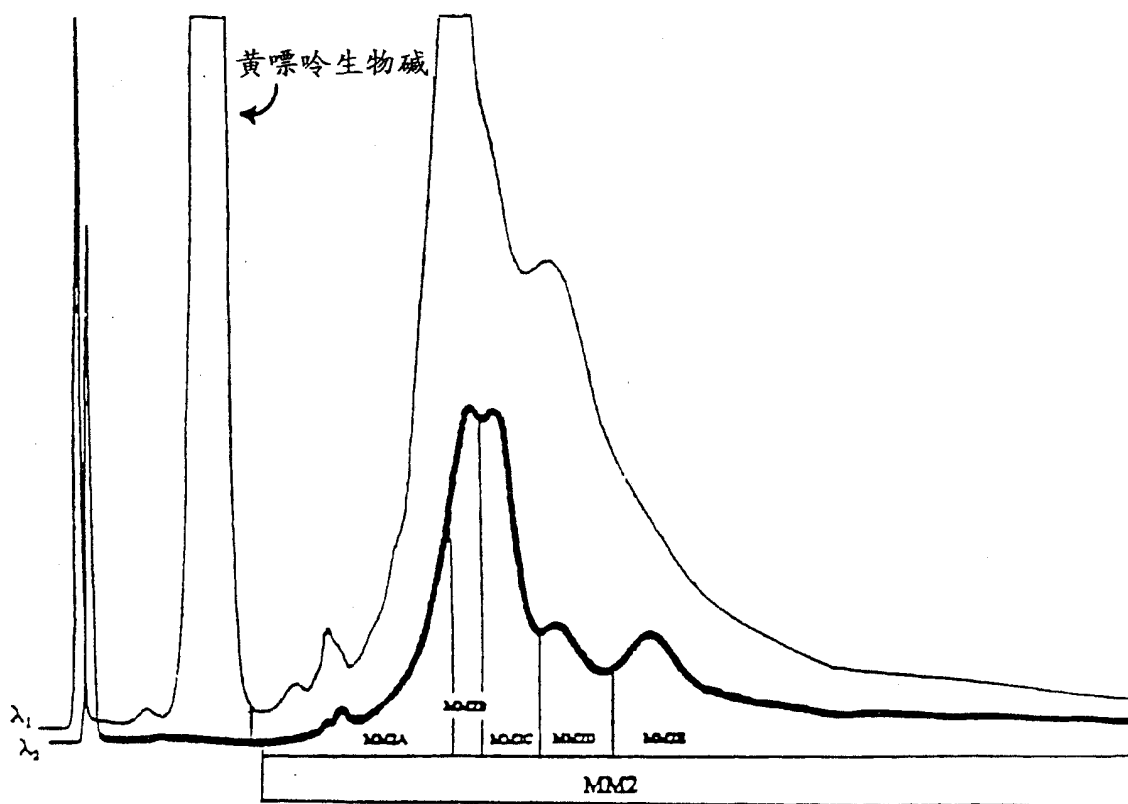
42. Wang, J.C., DNA 拓扑异构酶, 生化综述年刊, 54, 665-697(1985)。

43. Waters, R.L., Lyons, B.W., Li, T.M.和 Chen, D.J., 拓扑异构酶 II 在 DNA 双股螺旋断裂修补缺陷的中国仓鼠卵巢巢细胞系中的活性, 突变研究, 254:167(1991)。

44. Yamashita, Y., Kawada, S.-Z 和 Nakano, H., 非嵌合黄烷类诱导的哺乳类拓扑异构酶 II 依赖的 DNA 分裂, 生化药物, 39:4, 737-744(1990)。

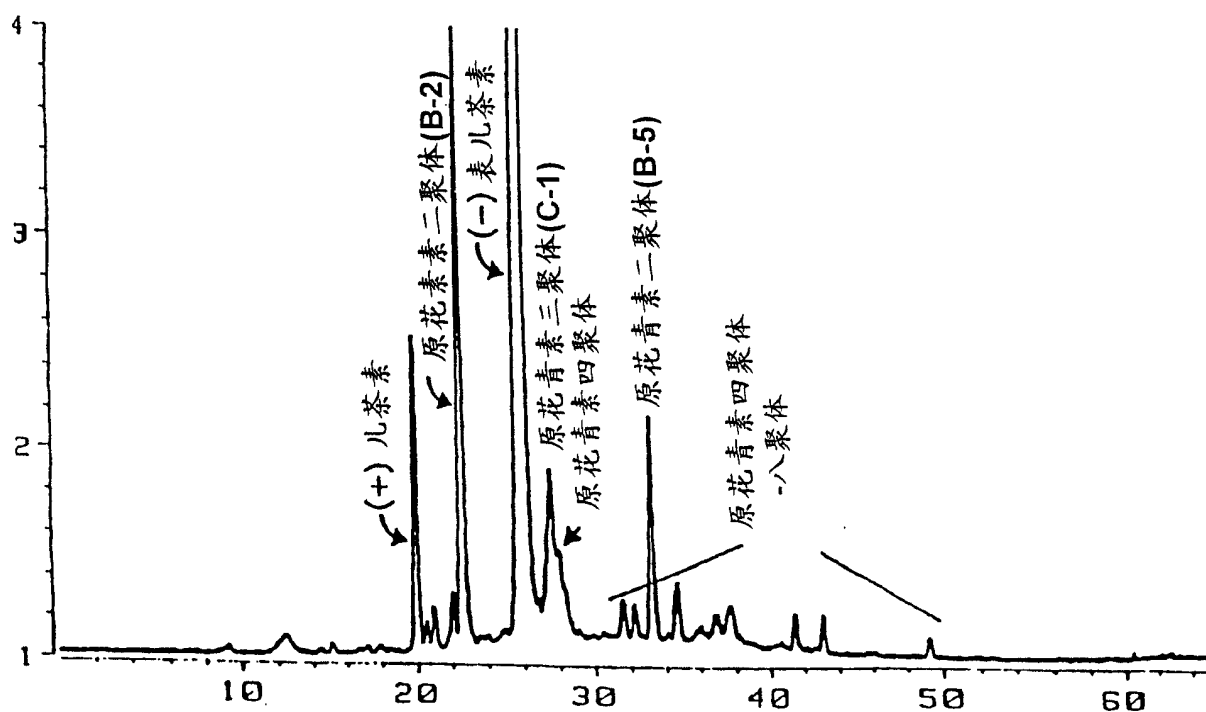
45. Yamashita, Y., Kawada, S.-Z., Fujii, N.和 Nakano, H., 从真菌中提取的新抗癌剂, Saintopin 诱导的哺乳类拓扑异构酶 I 和 II 介导的 DNA 分裂, 生化, 30,5838-5845。

图 1: 原花青素粗提物在Sephadex LH-20 上的凝胶渗透色谱



色谱条件:柱:28 × 25cm Sephadex LH-20,流动相:甲醇/水
分段梯度:15:85, 25:75, 35:65, 70:30, 100:0, 每段间隔1/2
小时,流速:1.5ml/min,检测器:UV@ λ_1 = 254nm, λ_2 = 365nm,
记录速率:0.5mm/min, 上柱量:120mg。

图 2 A: 从UIT-1未发酵的可可中提取的可可原花青素的洗脱曲线



HPLC条件:惠普1090 Ternary HPLC 系统,装配有HP 1046A型可编程荧光检测器

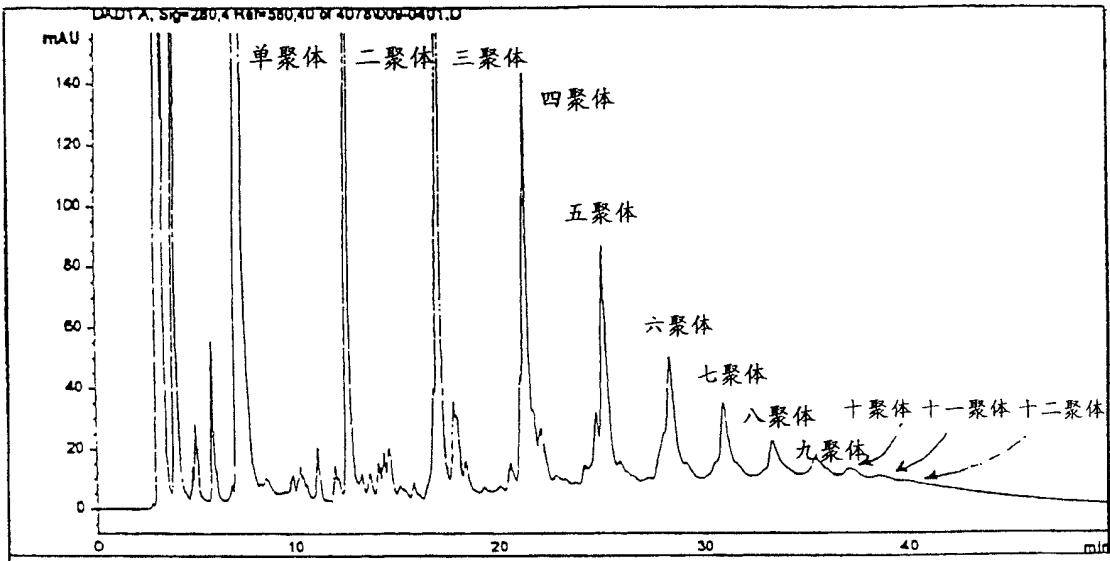
柱:5 μ Hypersil ODS (200 $\times$ 2.1mm);

60% B加入A中形成的线性梯度,流速 0.3ml/min

B=0.5%溶于甲醇的乙酸;A=0.5%溶于去离子水的乙酸

$\lambda_{\text{ex}} = 280\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 316\text{nm}$

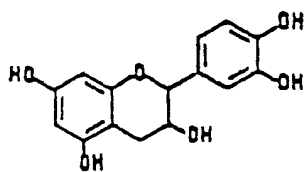
图 2 B: 可可原花青素的分析型正相HPLC分离



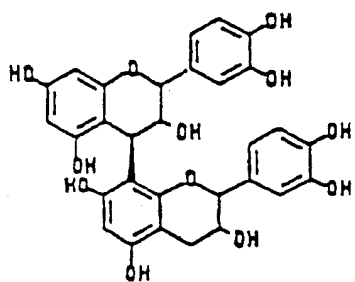
HPLC 条件:

250 x 3.2mm Lichrosphere 5 Silica 柱(5μ)			
20 x 4.6mm Supelguard LC-Si (5μ) 保护柱			
检测器:发光二极管阵列 @ 280nm			
梯度:时间(分钟)	CH ₂ Cl ₂	甲醇	乙酸/水(1:1)
0	82	14	4
30	67.6	28.4	4
60	46	50	4
65	10	86	4
70	10	86	4
流速: 0.5 mL/min			
柱温: 37°C			

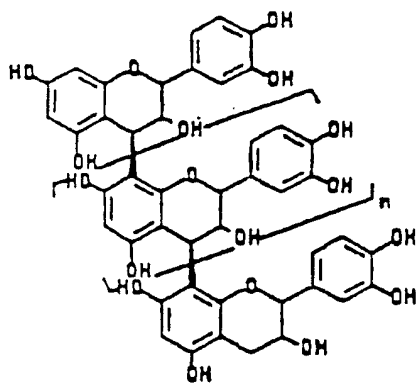
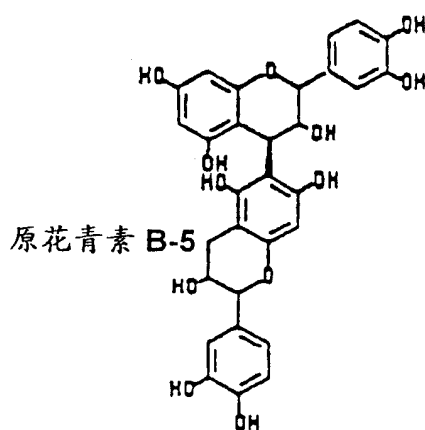
图 3: 可可原花青素的典型结构



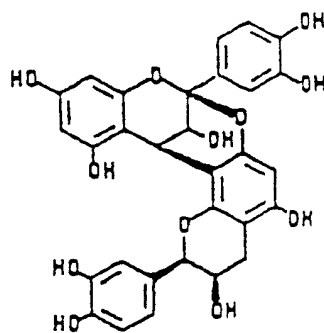
(-)-表儿茶素



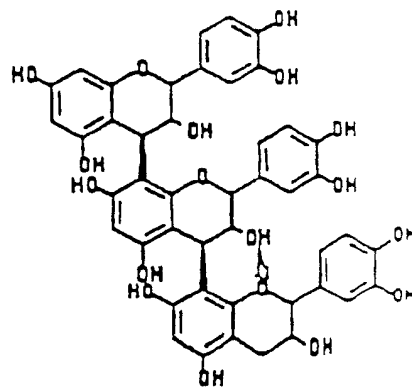
原花青素 B-2

原花青素寡聚物 $n=2$ 至 S 

原花青素 B-5



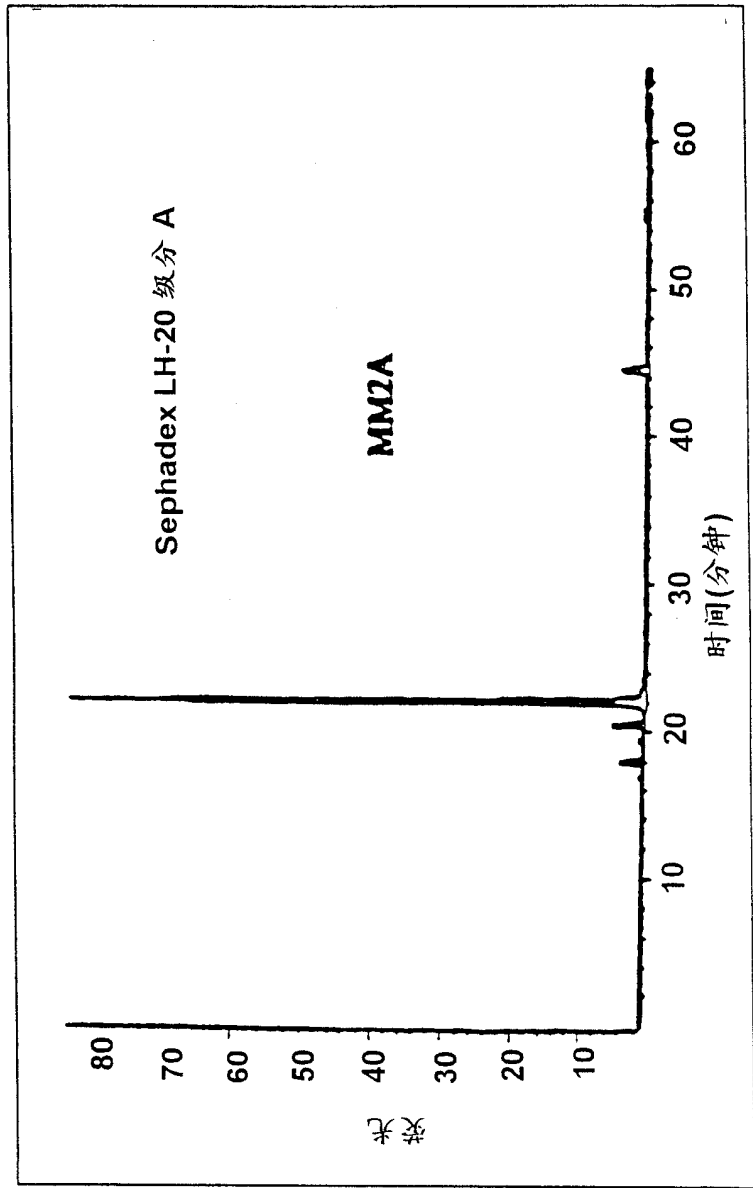
原花青素 R-2



原花青素 C-1

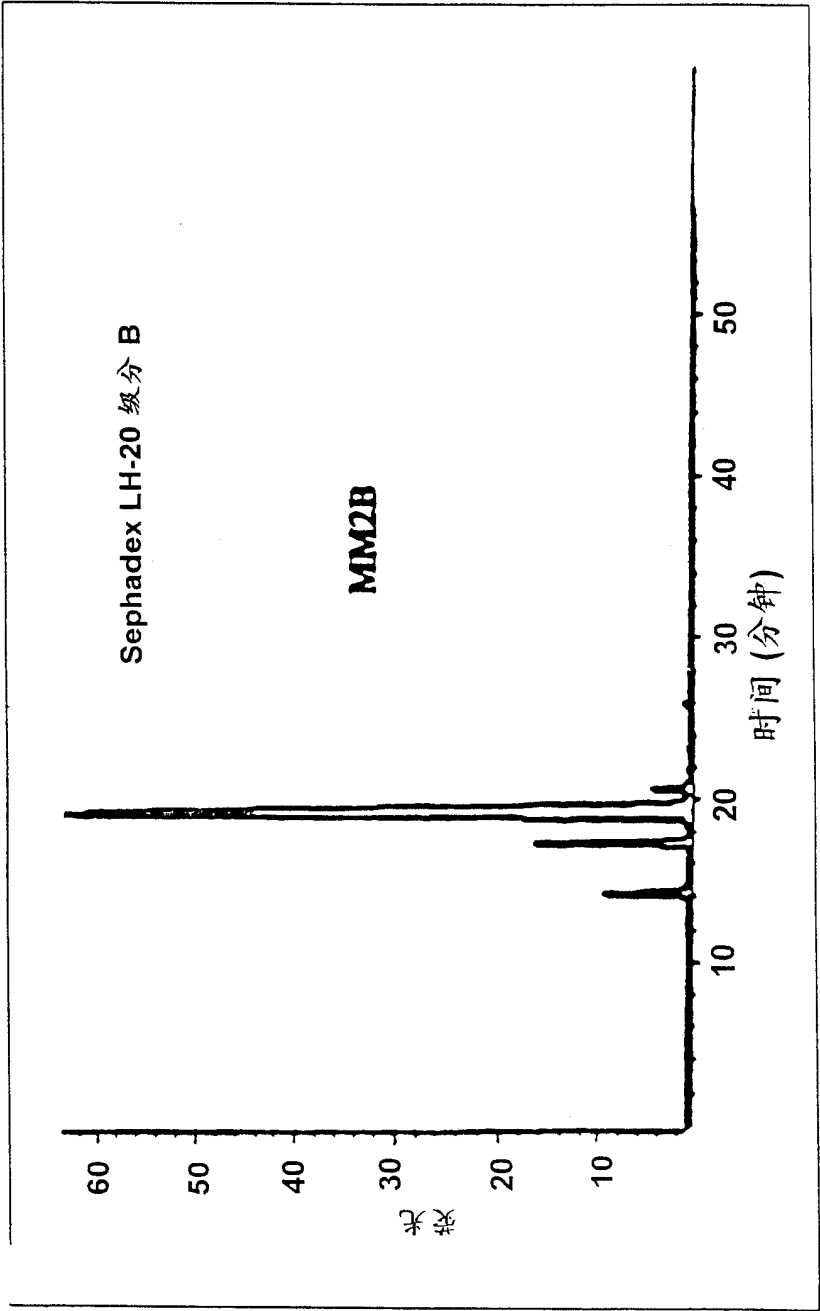
HPLC条件:惠普1090 Ternary HPLC 系统,装配有HP 1046A型可编程荧光检测器
柱:5 μ Hypersil ODS (200 $\times$ 2.1mm);
60% B加入A中形成的线性梯度,流速 0.3ml/min
B=0.5%溶于甲醇的乙酸;A=0.5%溶于去离子水的乙酸
 λ_{ex} =280nm, λ_{em} =316nm

图 4 A: 原花青素级分的典型HPLC图迹



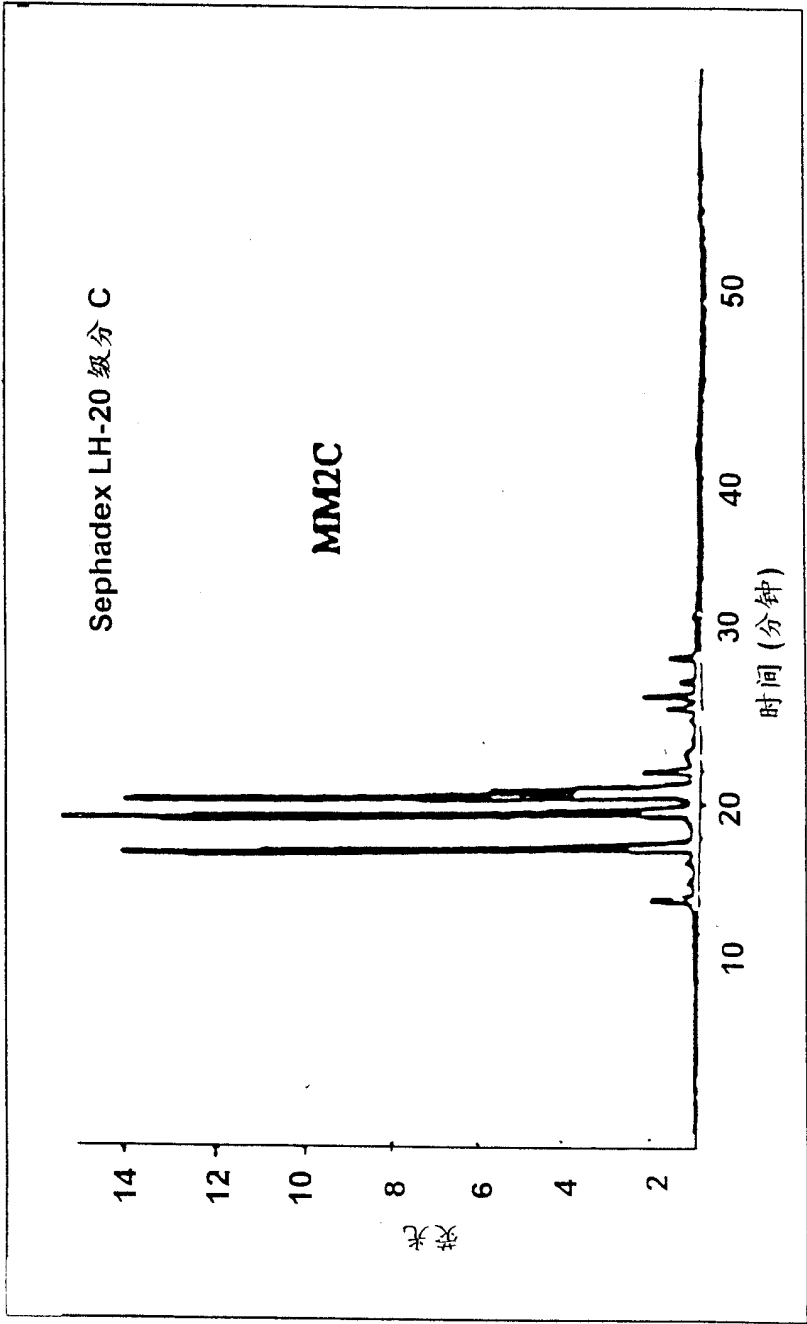
HPLC条件:惠普1090 Ternary HPLC 系统,配有HP 1046A型可编程荧光检测器
柱:5 μ Hypersil ODS (200 $\times$ 2.1mm);
60% B加入A中形成的线性梯度,流速 0.3ml/min
B=0.5%溶于甲醇的乙酸;A=0.5%溶于去离子水的乙酸
 λ_{ex} =280nm, λ_{em} =316nm

图 4 B: 原花青素级分的典型HPLC图迹



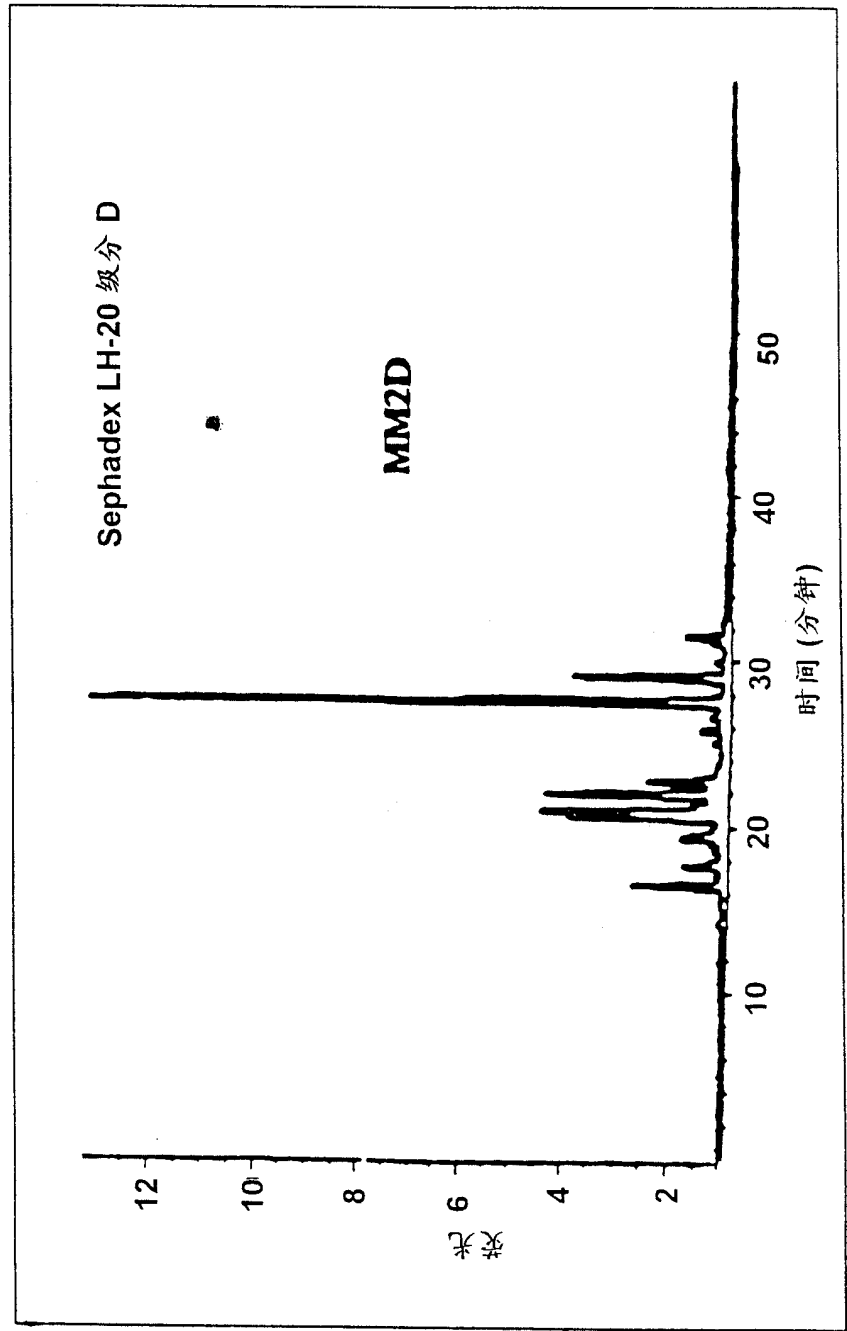
HPLC条件:惠普1090 Ternary HPLC 系统,装配有HP 1046A型可编程荧光检测器
柱:5 μ Hypersil ODS (200 $\times$ 2.1mm);
60% B加入A中形成的线性梯度,流速 0.3ml/min
B=0.5%溶于甲醇的乙酸;A=0.5%溶于去离子水的乙酸
 λ_{ex} =280nm, λ_{em} =316nm

图 4 C: 原花青素级分的典型HPLC图迹



HPLC条件:惠普1090 Ternary HPLC 系统, 配有HP 1046A型可编程荧光检测器
柱: 5 μ Hypersil ODS (200 $\times$ 2.1mm);
60% B加入A中形成的线性梯度, 流速 0.3ml/min
B=0.5%溶于甲醇的乙酸; A=0.5%溶于去离子水的乙酸
 λ_{ex} =280nm, λ_{em} =316nm

图 4 D: 原花青素级分的典型HPLC图迹



HPLC条件:惠普1090 Ternary HPLC 系统, 配有HP 1046A型可编程荧光检测器
柱:5 μ Hypersil ODS (200 $\times$ 2.1mm);
60% B加入A中形成的线性梯度,流速 0.3ml/min
B=0.5%溶于甲醇的乙酸;A=0.5%溶于去离子水的乙酸
 λ_{ex} =280nm, λ_{em} =316nm

图 4 E: 原花青素级分的典型HPLC图迹

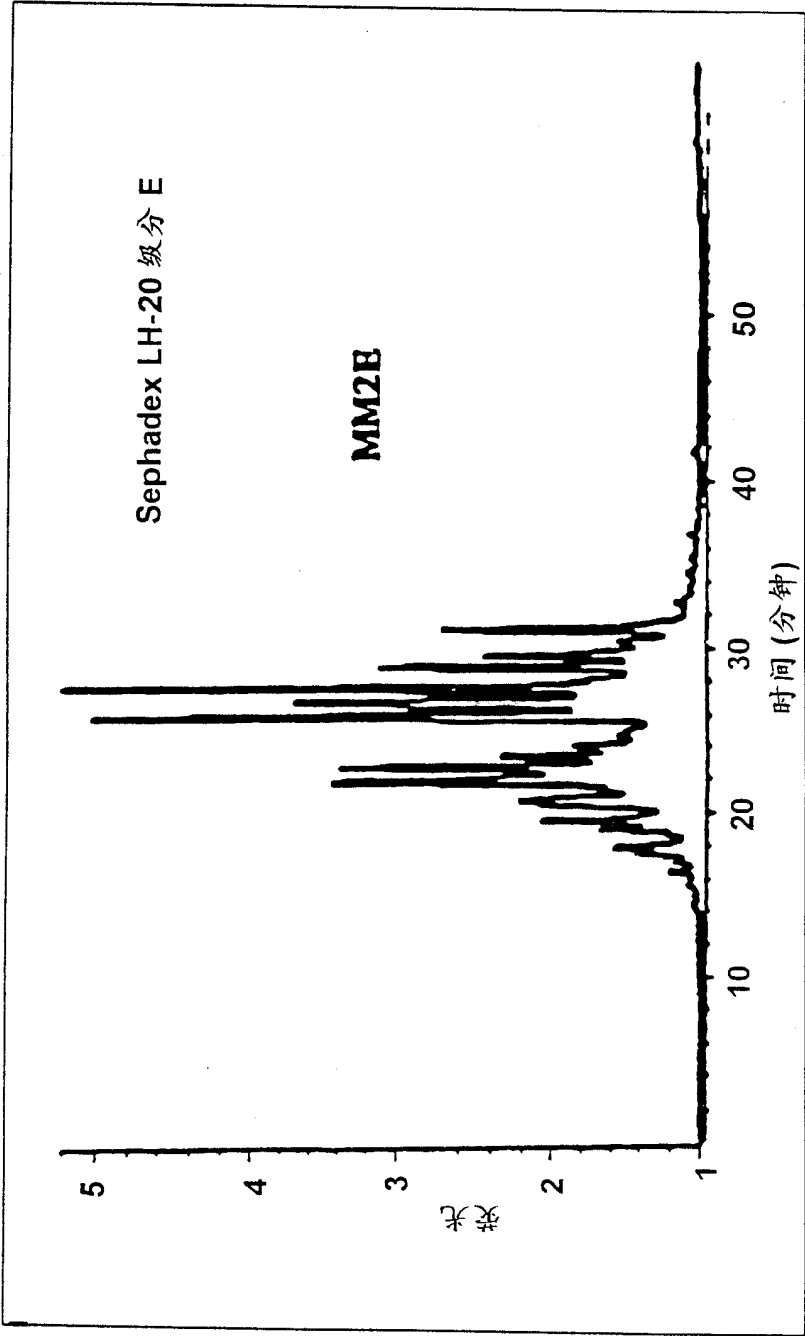
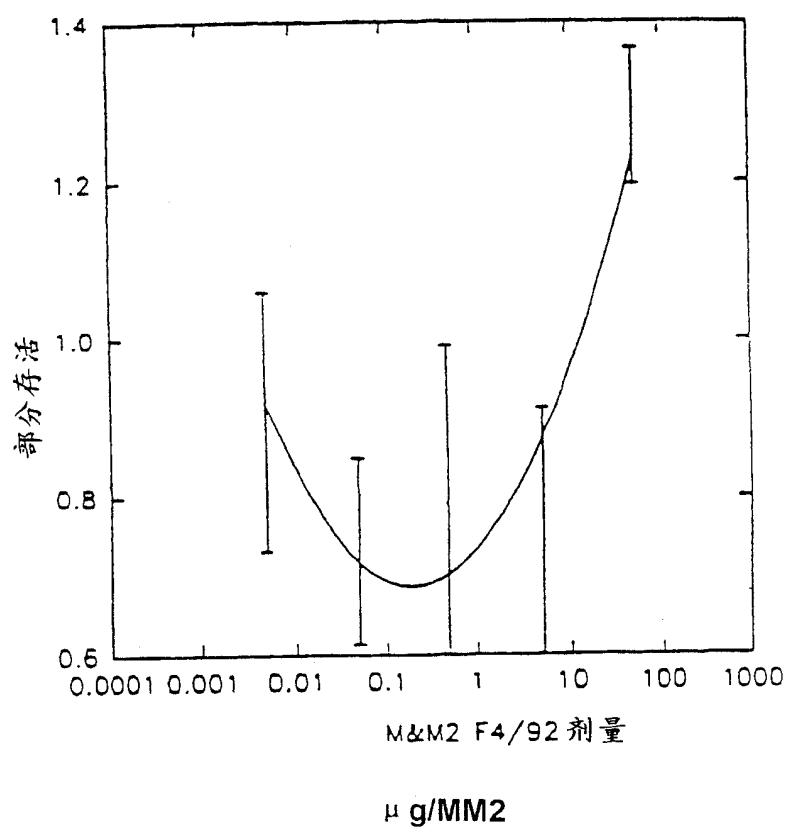


图 5: MM2的量和ACHN存活之间的剂量-反应关系



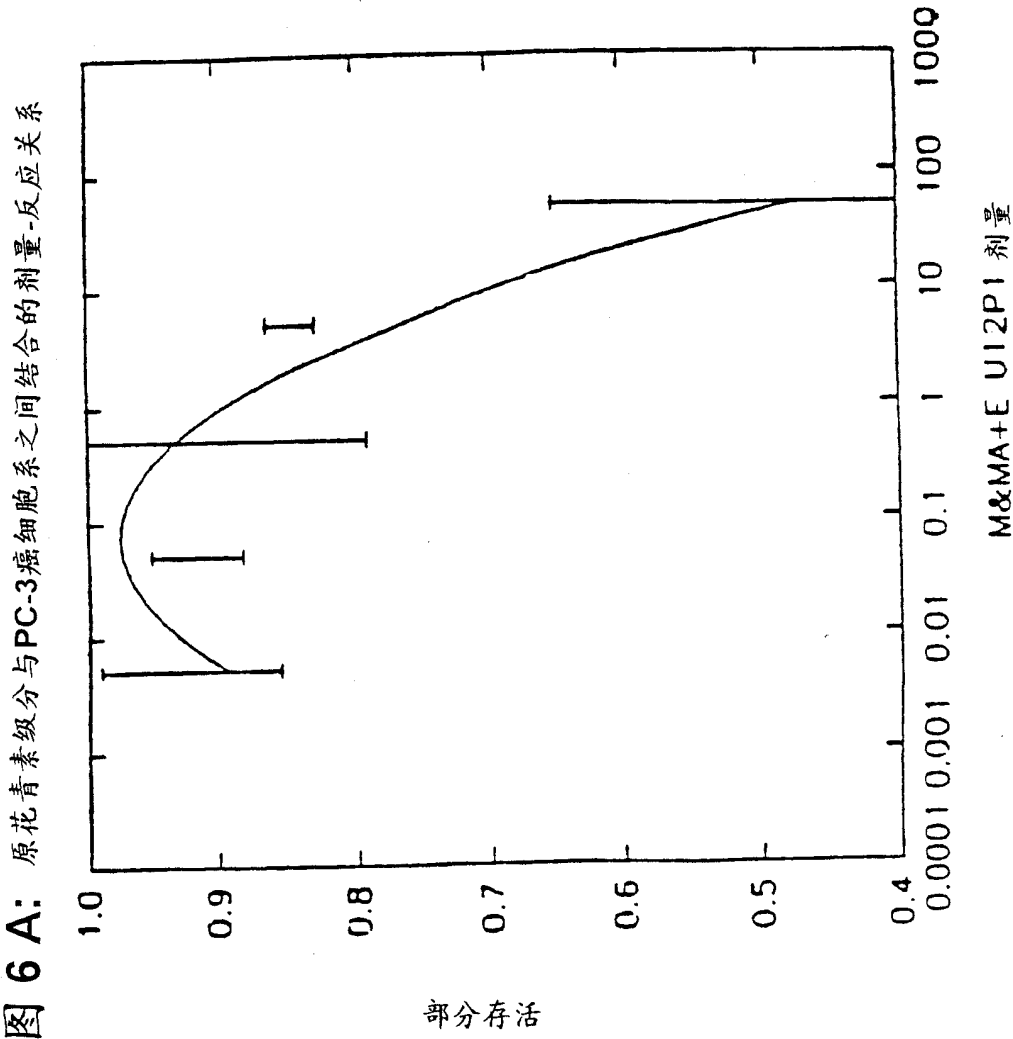


图 6 B: 原花青素级分与PC-3癌细胞系之间结合的剂量-反应关系

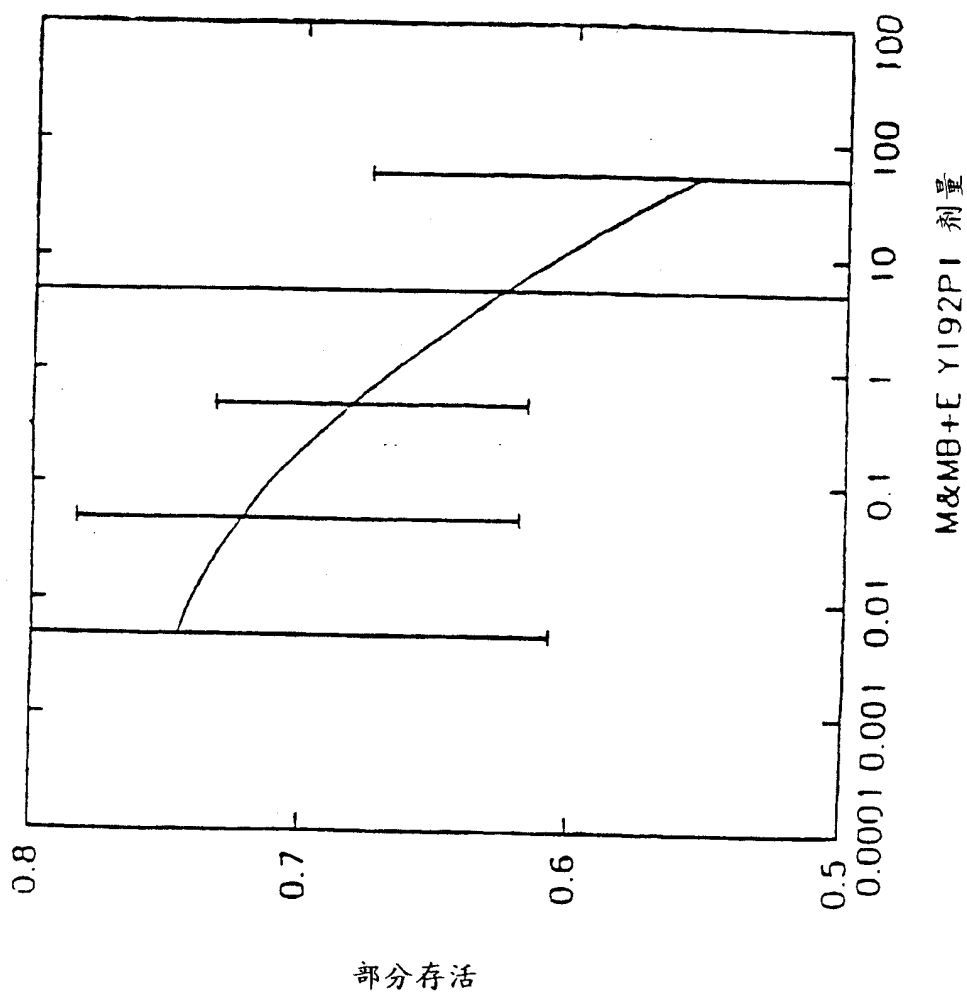


图 6 C: 原花青素级分与PC-3癌细胞系之间结合的剂量-反应关系

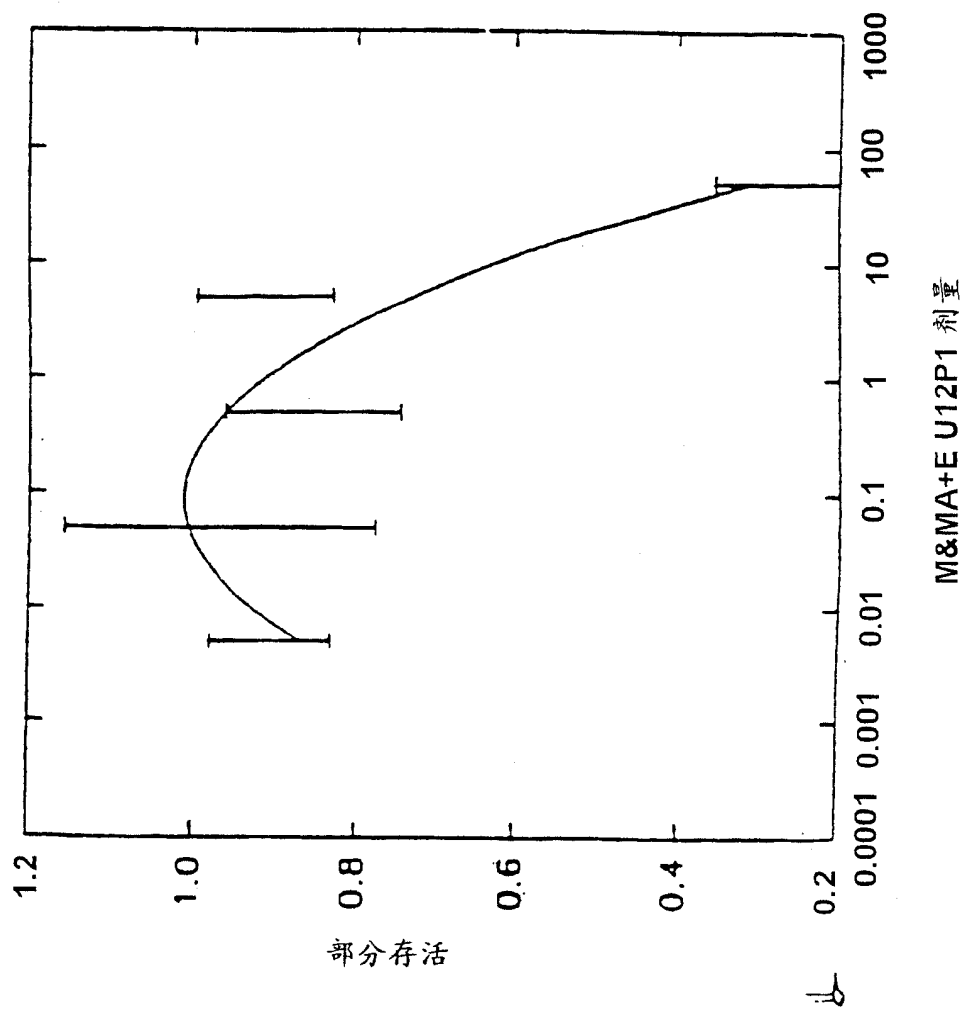


图 6 D: 原花青素级分与PC-3癌细胞系之间结合的剂量-反应关系

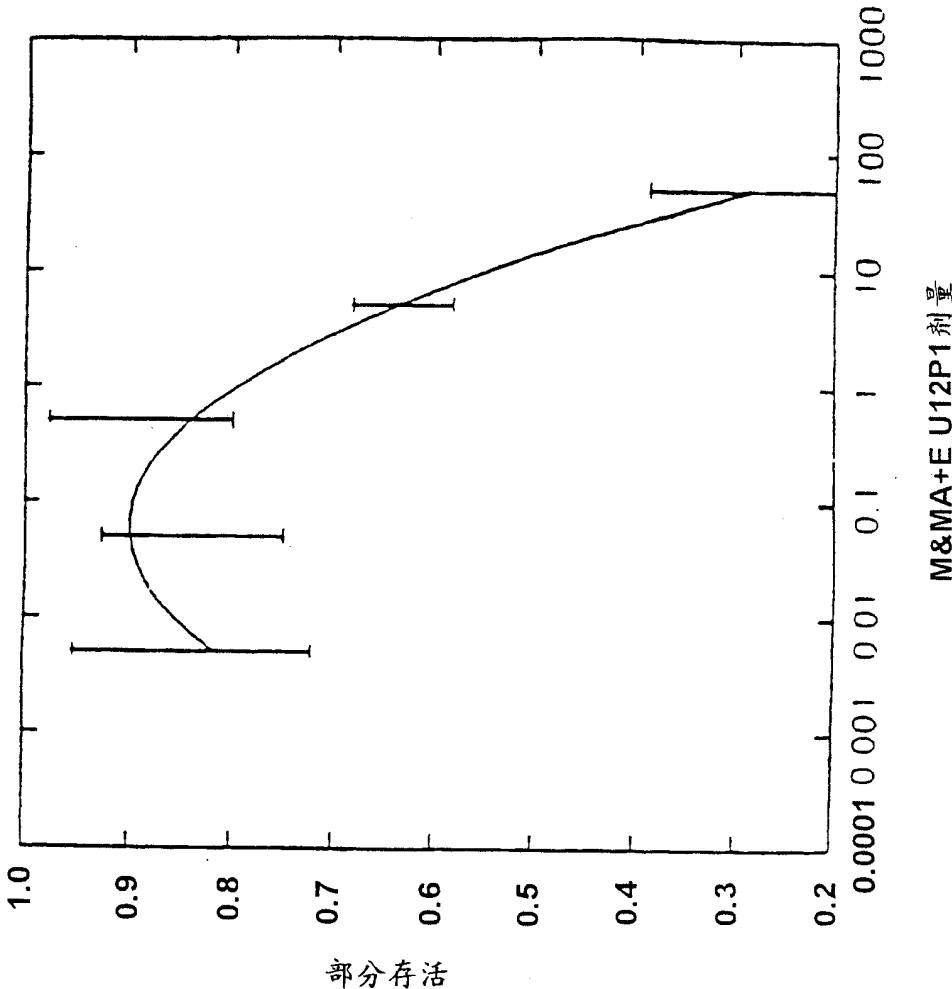


图 7 A: 可可原花青素级分和PC-3前列腺细胞系
之间的剂量-反应关系

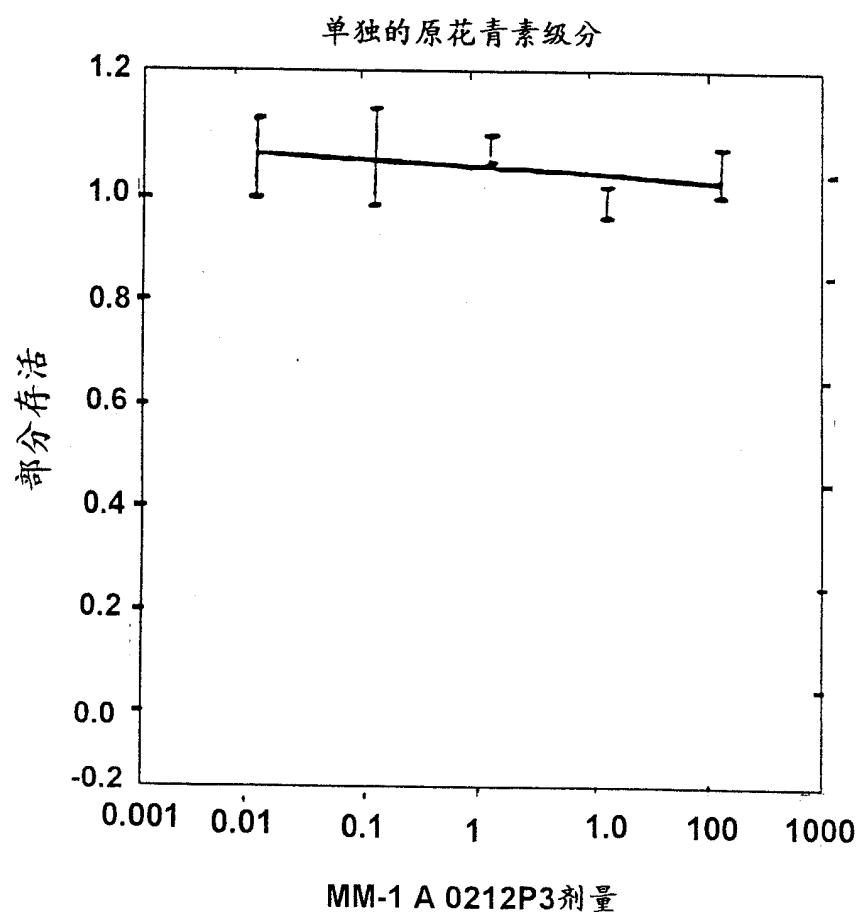


图 7 B: 可可原花青素级分和PC-3前列腺细胞系
之间的剂量-反应关系

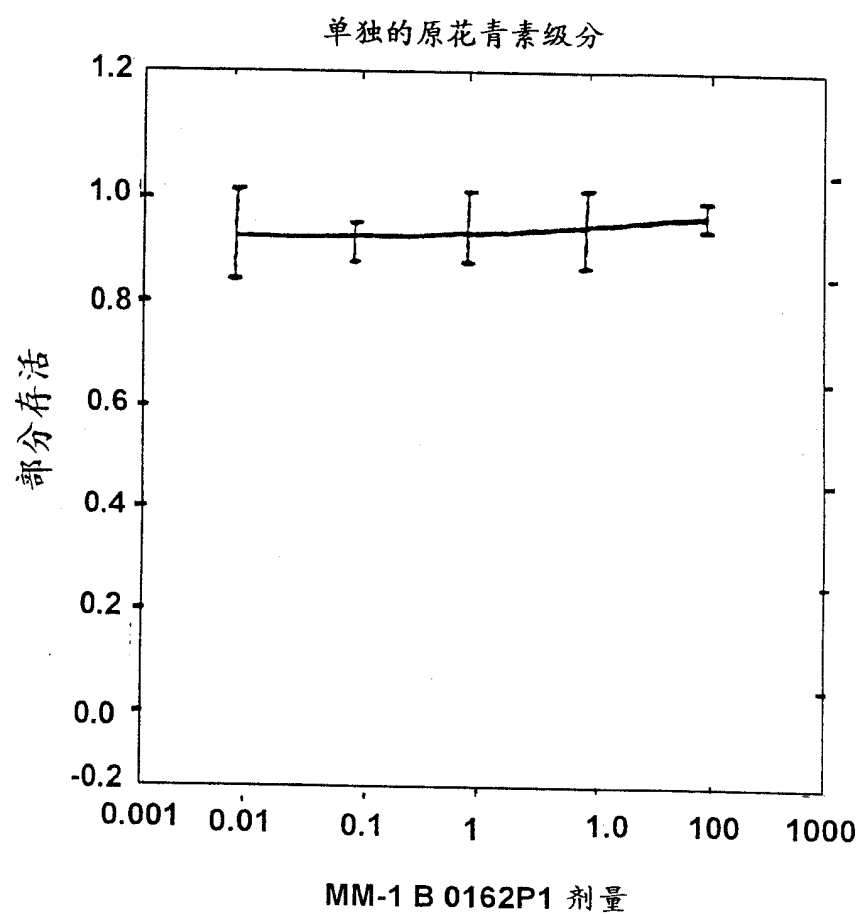


图 7C: 可可原花青素级分和PC-3前列腺细胞系之间的剂量-反应关系

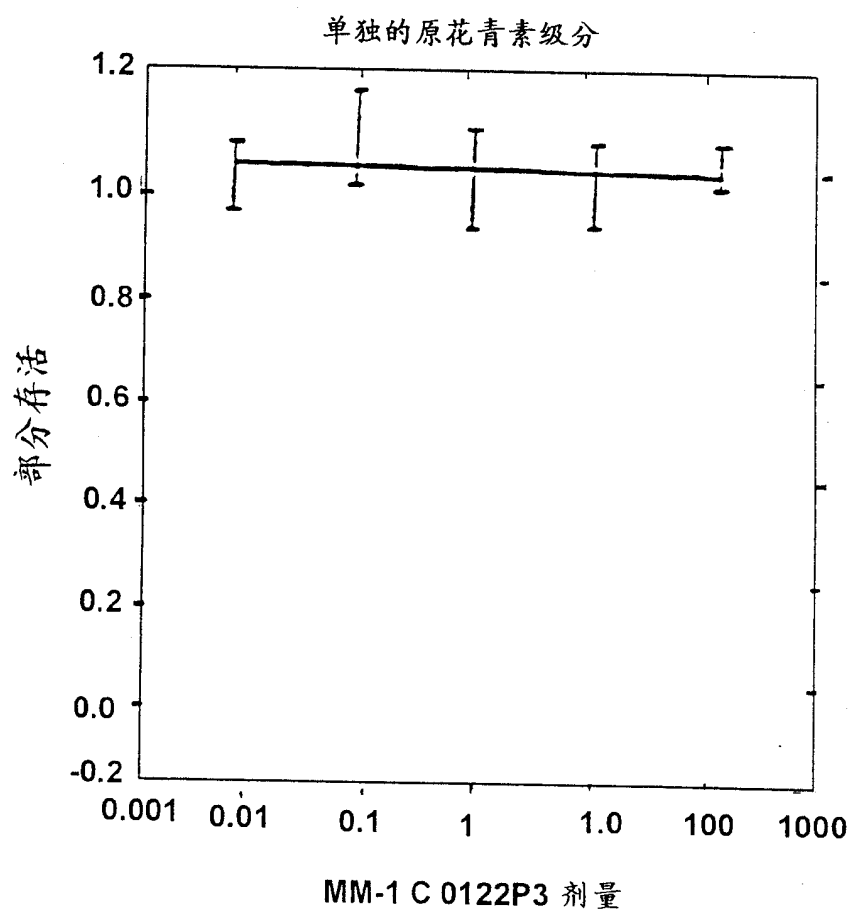


图 7D: 可可原花青素级分和PC-3前列腺细胞系之间的剂量-反应关系

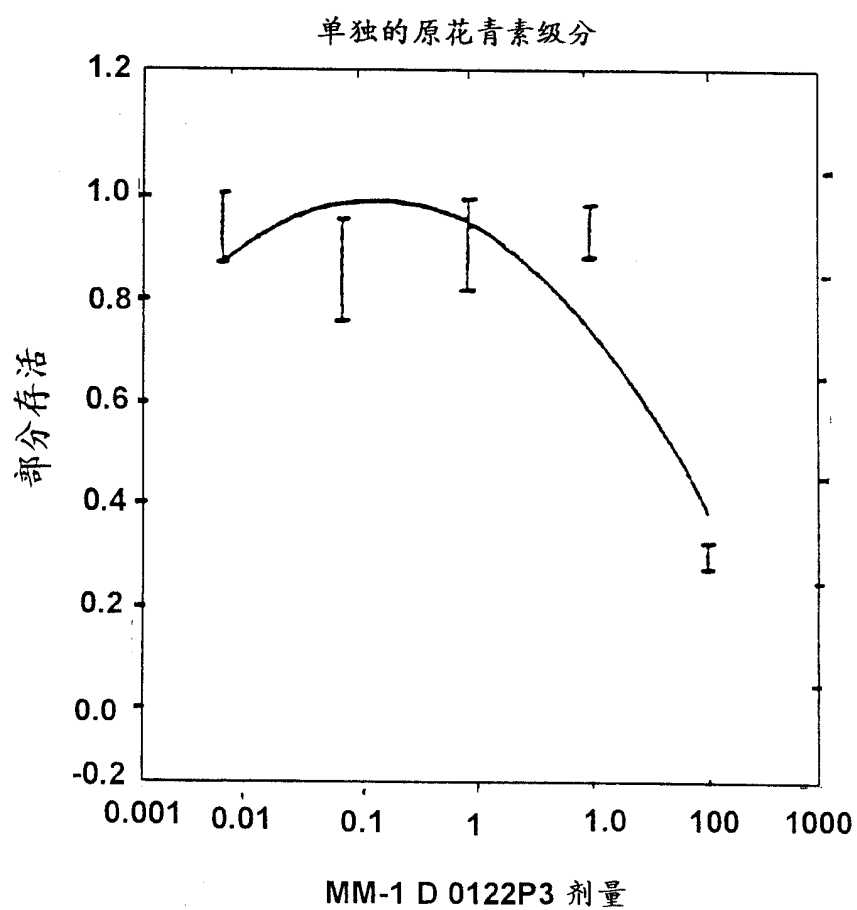


图 7E: 可可原花青素级分和PC-3前列腺细胞系之间的剂量-反应关系

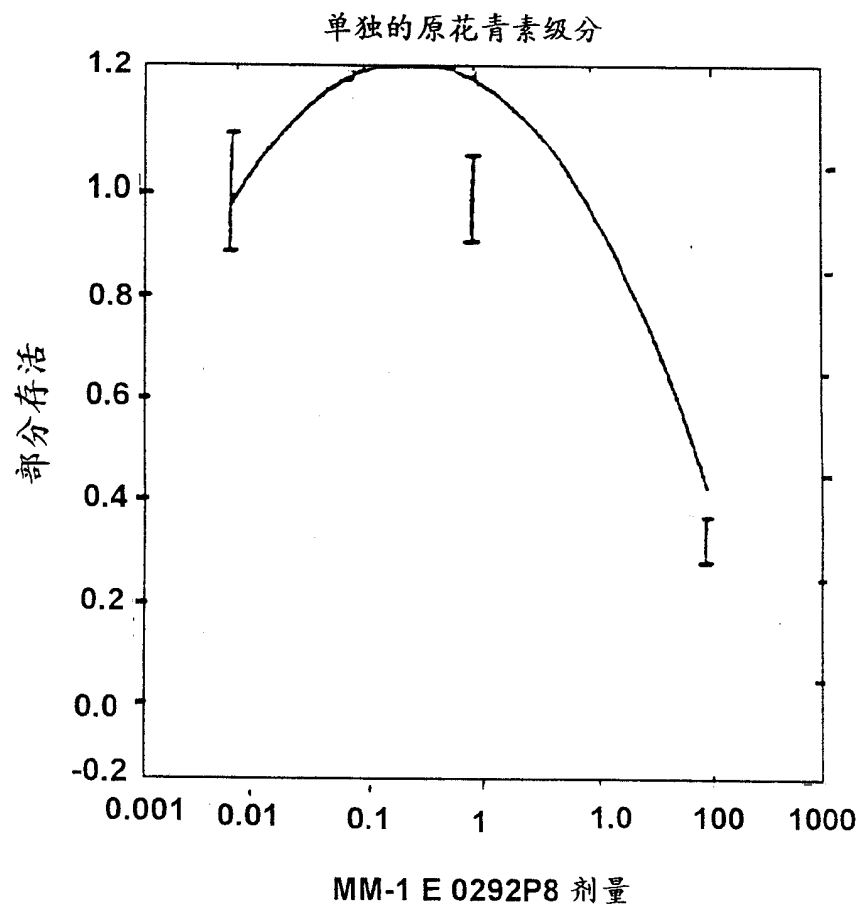


图 7F: 可可原花青素级分和PC-3前列腺细胞系
之间的剂量-反应关系

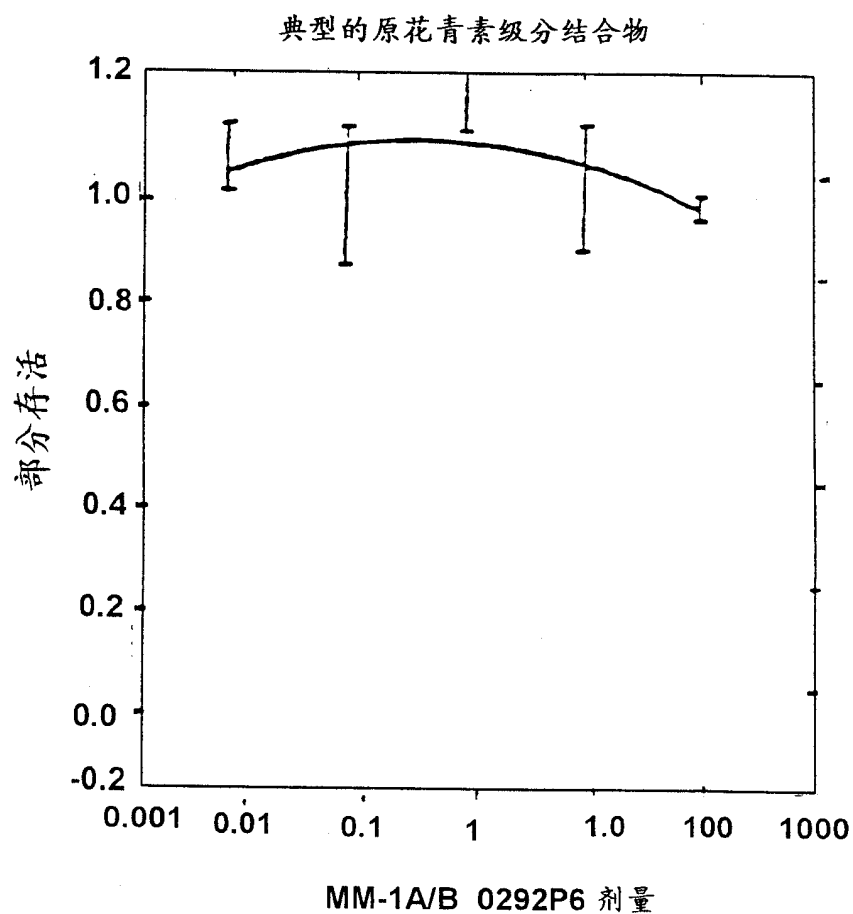


图 7G: 可可原花青素级分和PC-3前列腺细胞系
之间的剂量-反应关系

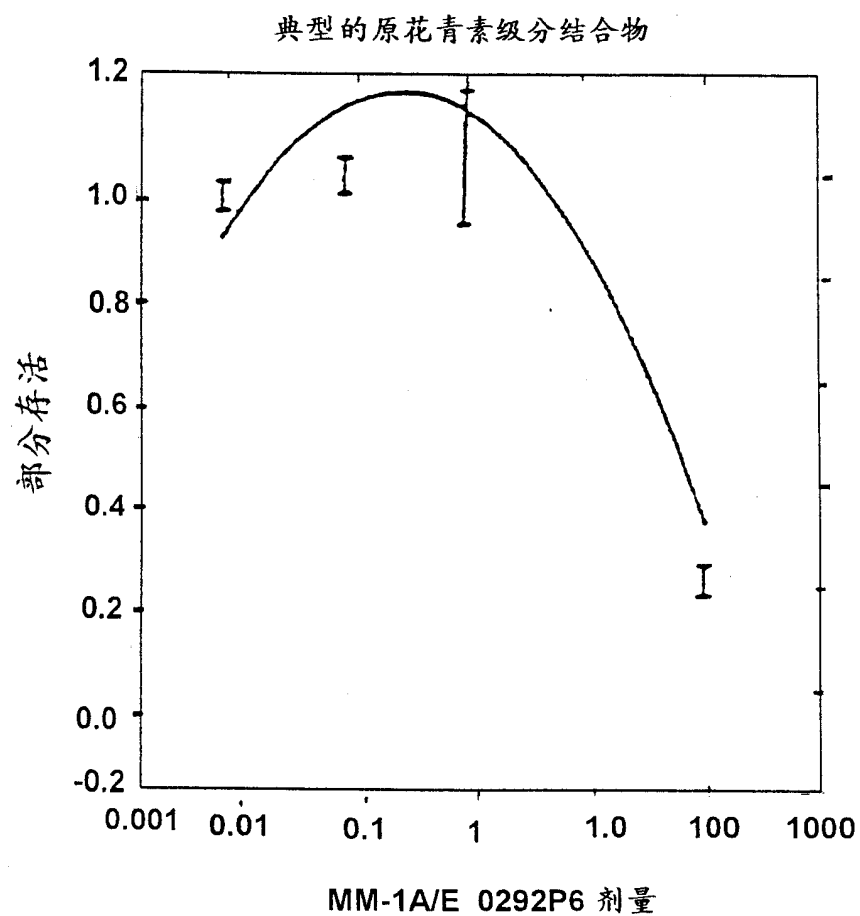


图 7H: 可可原花青素级分和PC-3前列腺细胞系
之间的剂量-反应关系

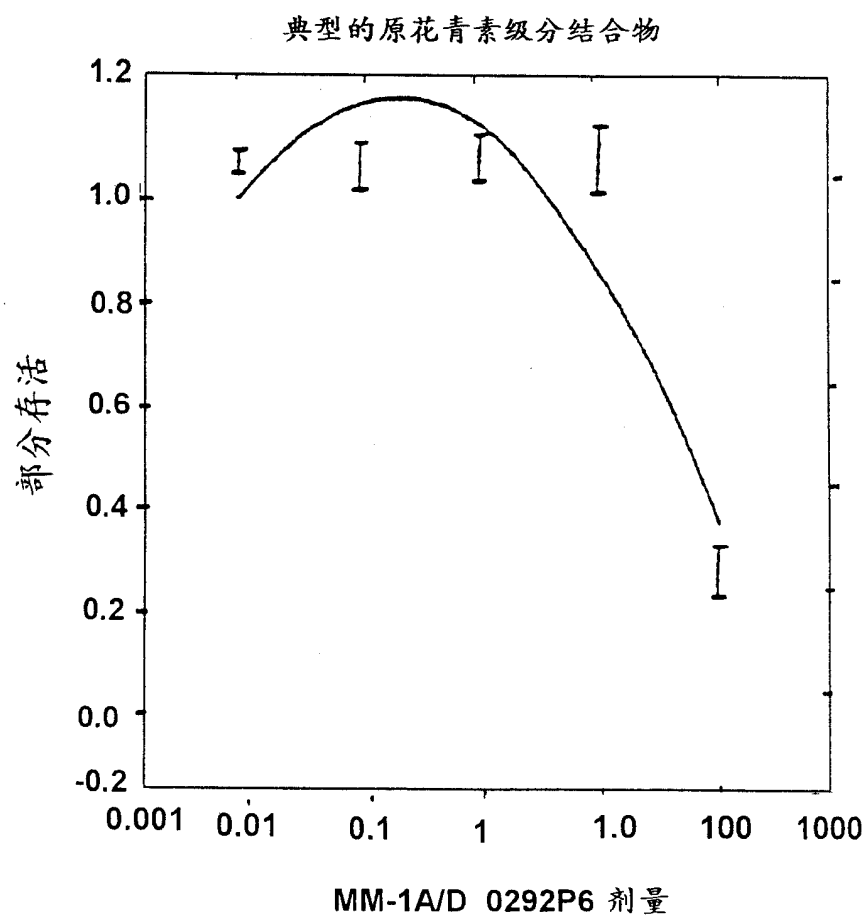


图 8 A: 可可原花青素级分和KB鼻咽癌/HeLa细胞系
之间的剂量-反应关系

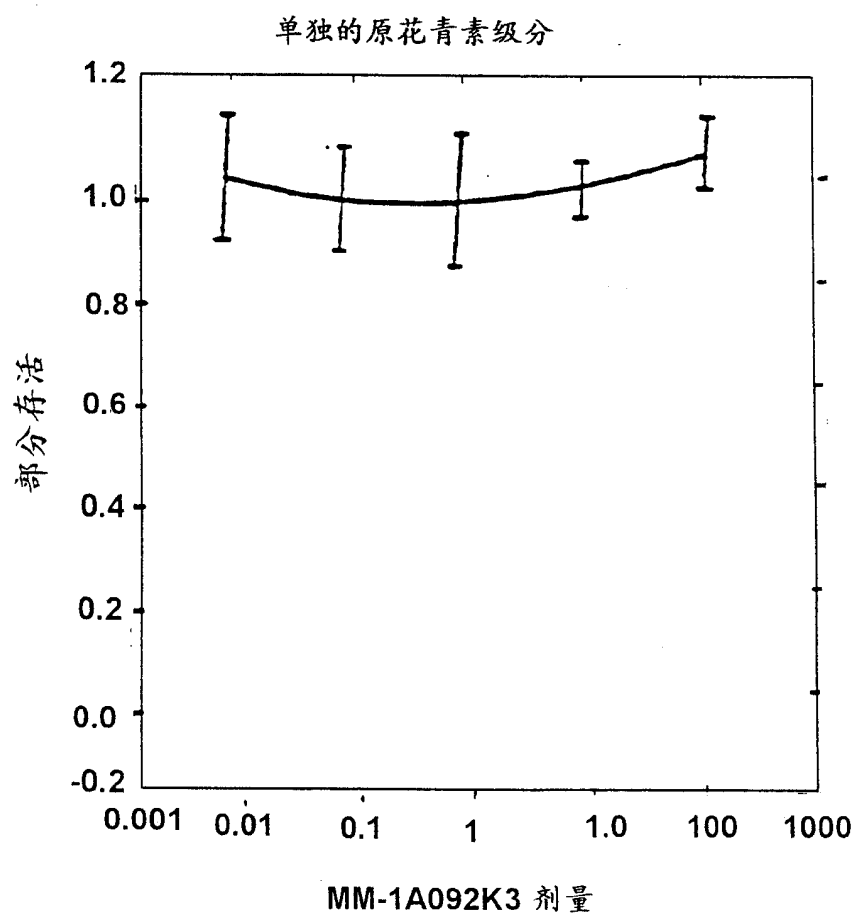


图 8 B: 可可原花青素级分和KB鼻咽癌/HeLa细胞系之间的剂量-反应关系

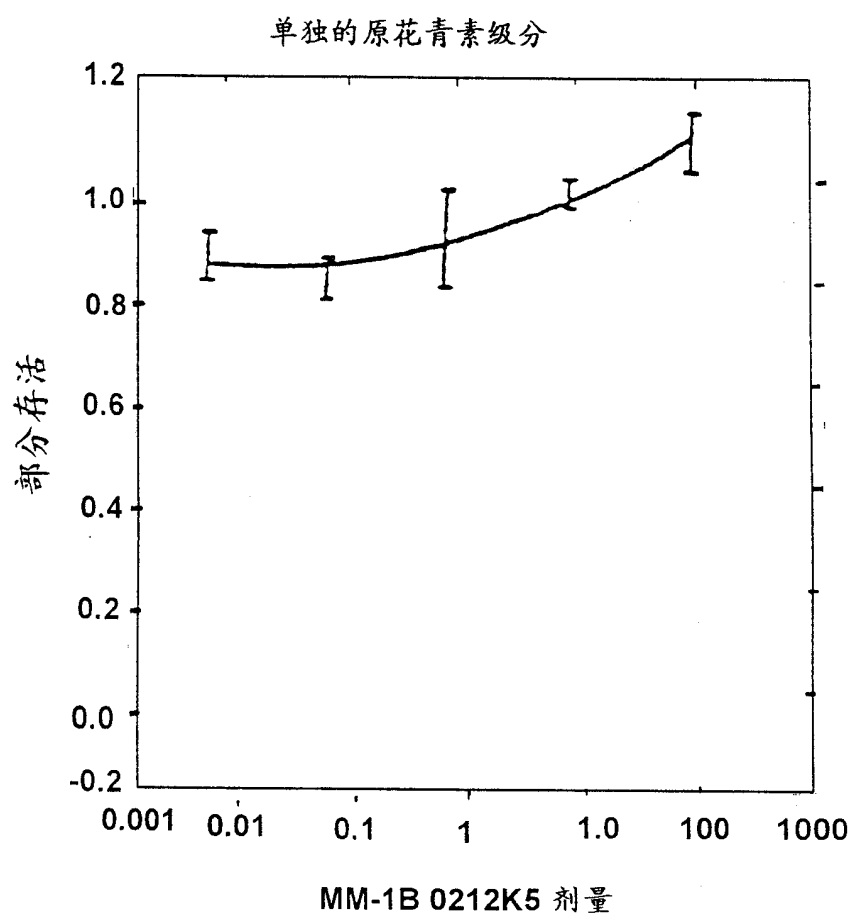


图 8 C: 可可原花青素级分和KB鼻咽癌/HeLa细胞系之间的剂量-反应关系

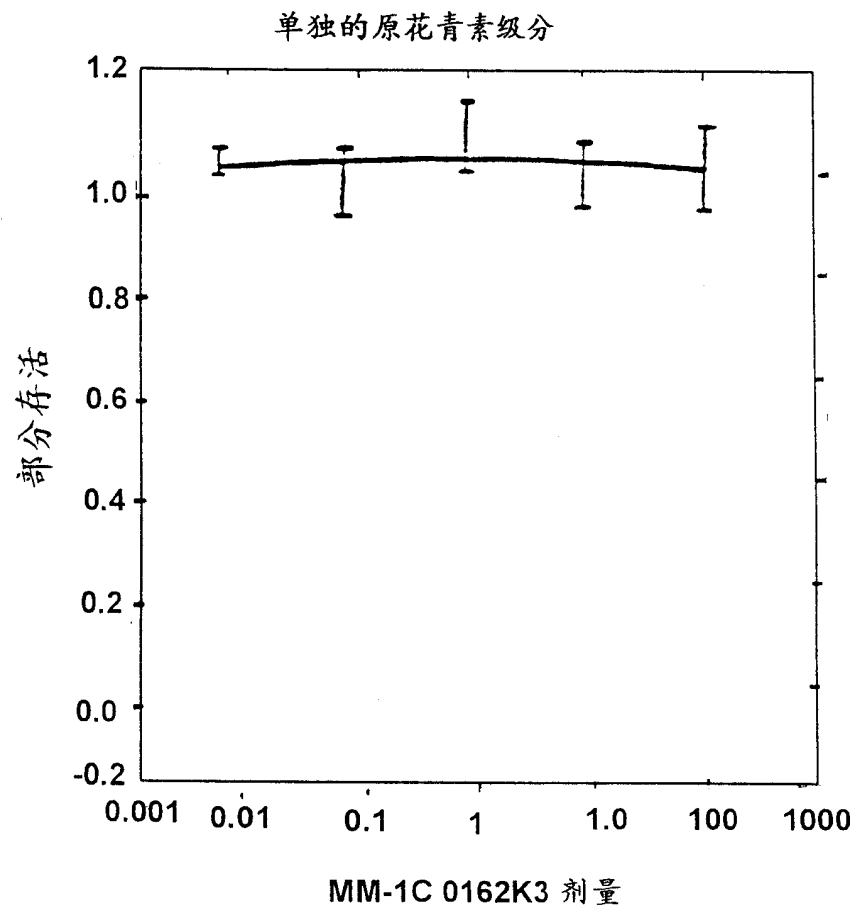


图 8 D: 可可原花青素级分和KB鼻咽癌/HeLa细胞系
之间的剂量-反应关系

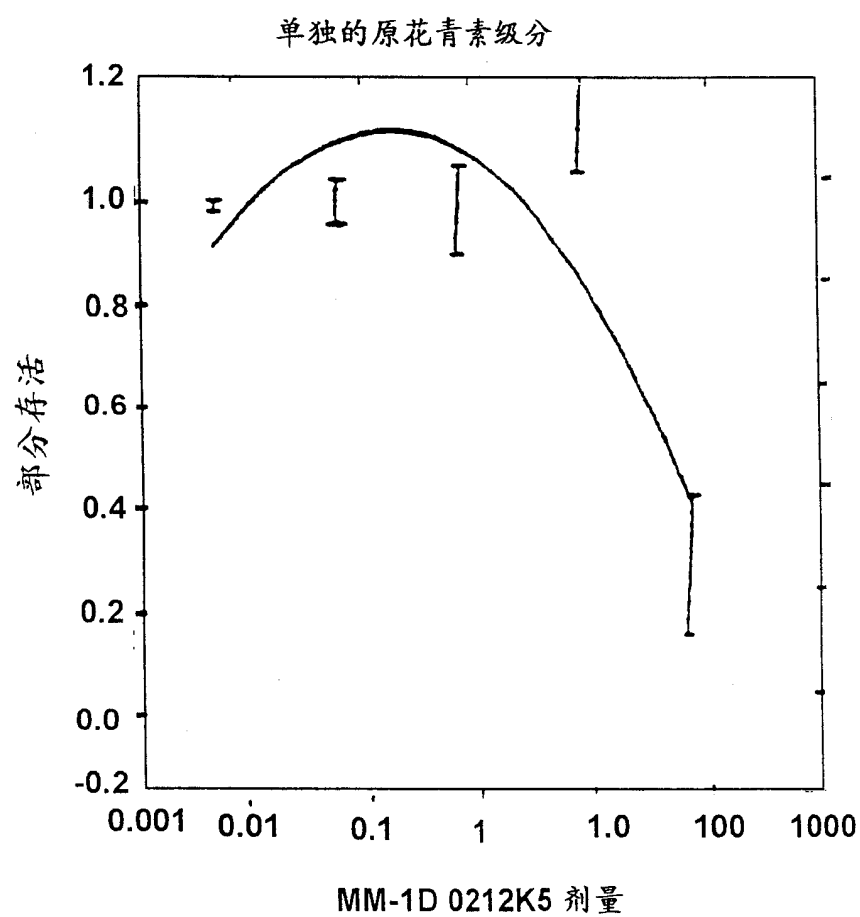


图 8 E: 可可原花青素级分和KB鼻咽癌/HeLa细胞系之间的剂量-反应关系

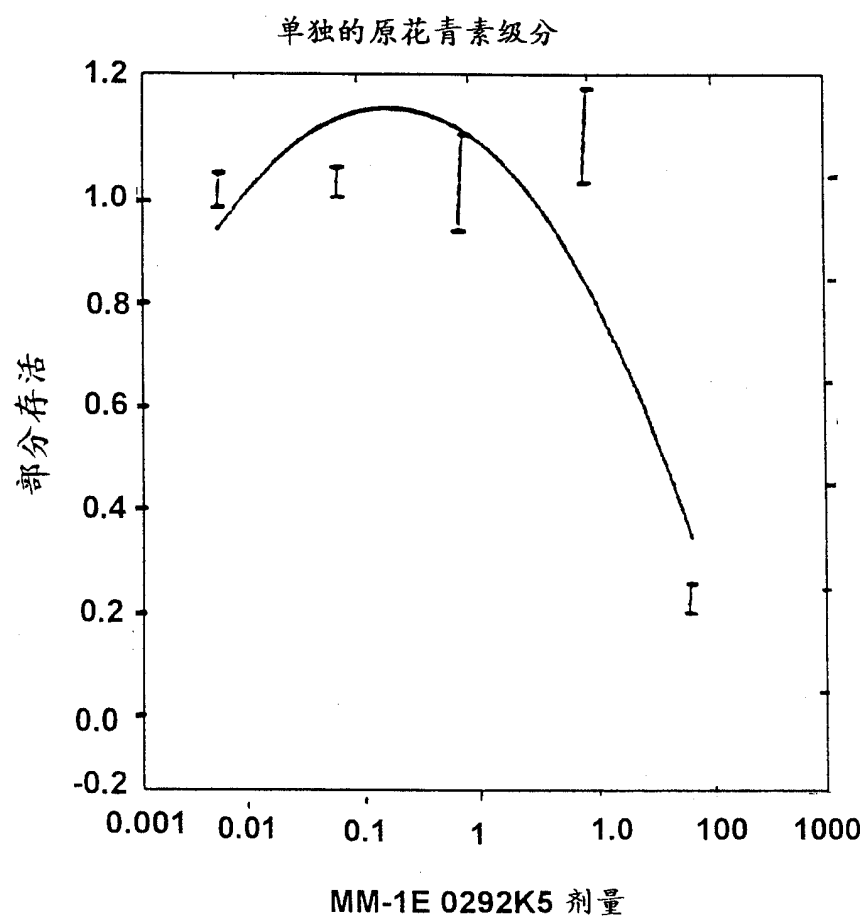


图 8 F: 可可原花青素级分和KB鼻咽癌/HeLa细胞系
之间的剂量-反应关系

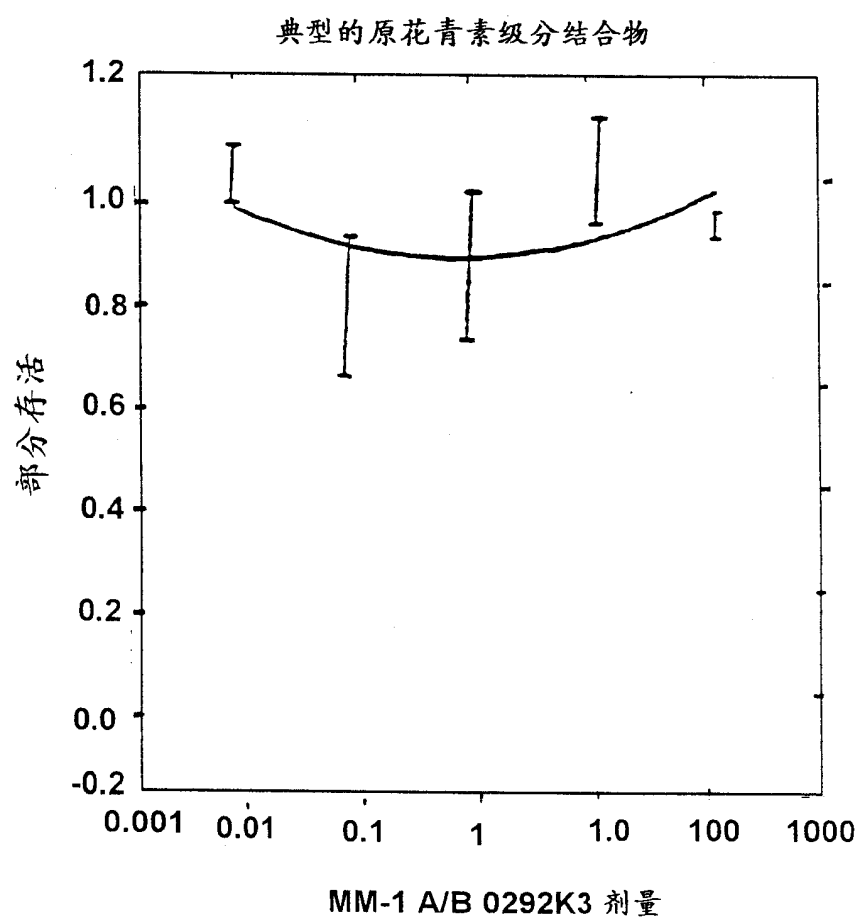


图 8 G: 可可原花青素级分和KB鼻咽癌/HeLa细胞系
之间的剂量-反应关系

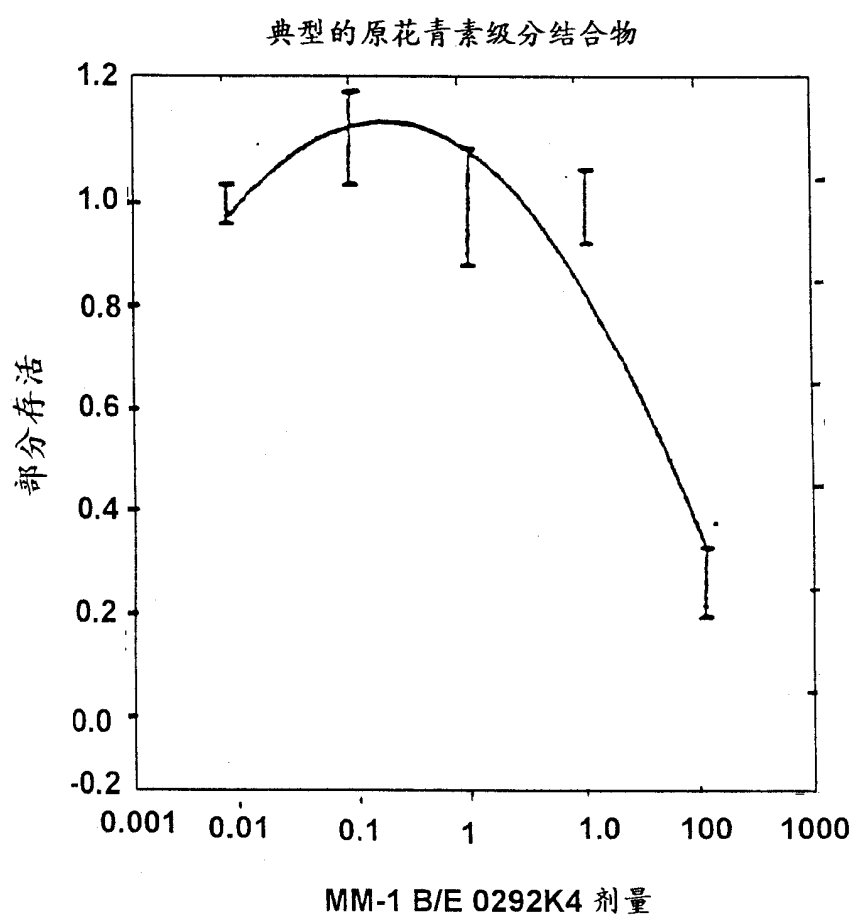


图 8 H: 可可原花青素级分和KB鼻咽癌/HeLa细胞系
之间的剂量-反应关系

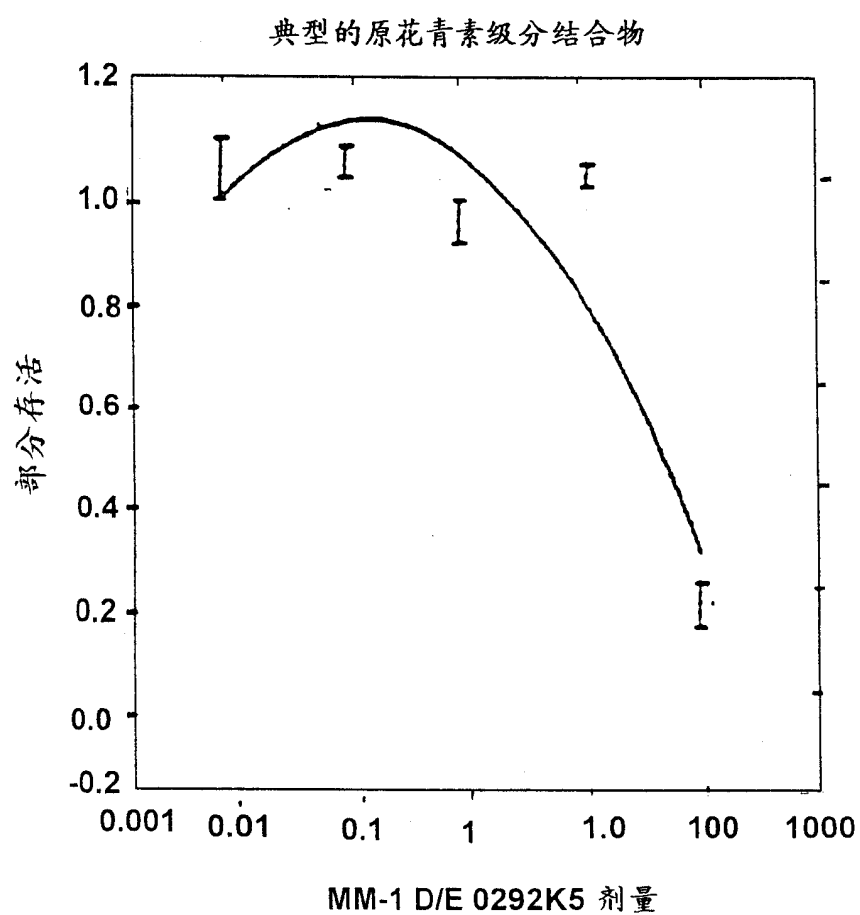


图 9 A: 可可原花青素级分和HCT-116细胞系
之间的剂量-反应关系

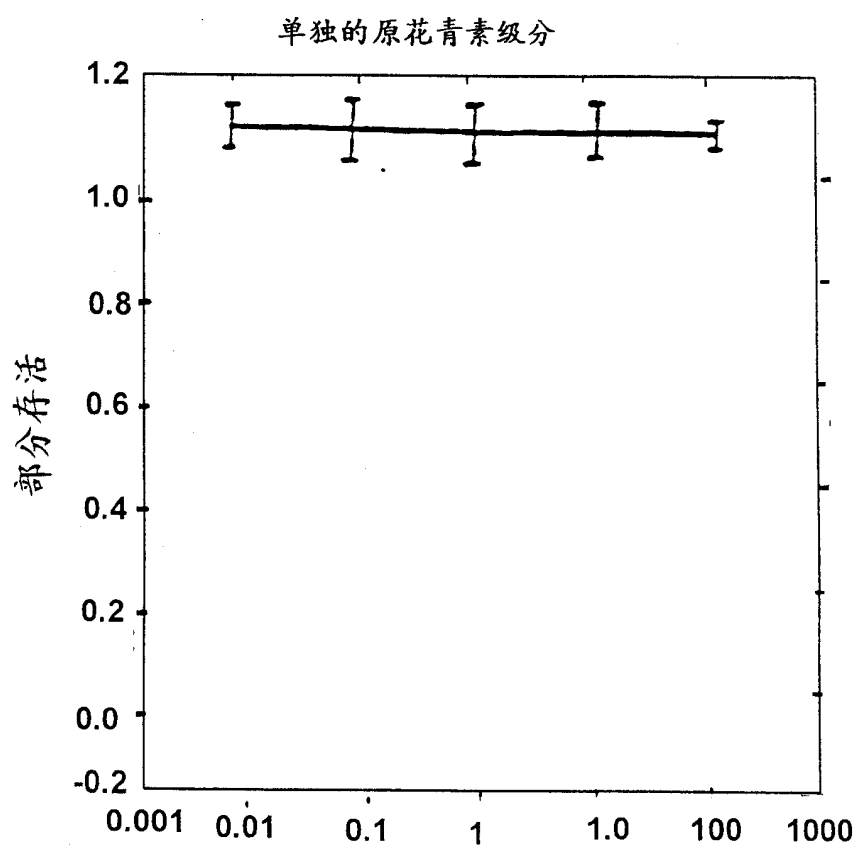


图 9 B: 可可原花青素级分和HCT-116细胞系
之间的剂量-反应关系

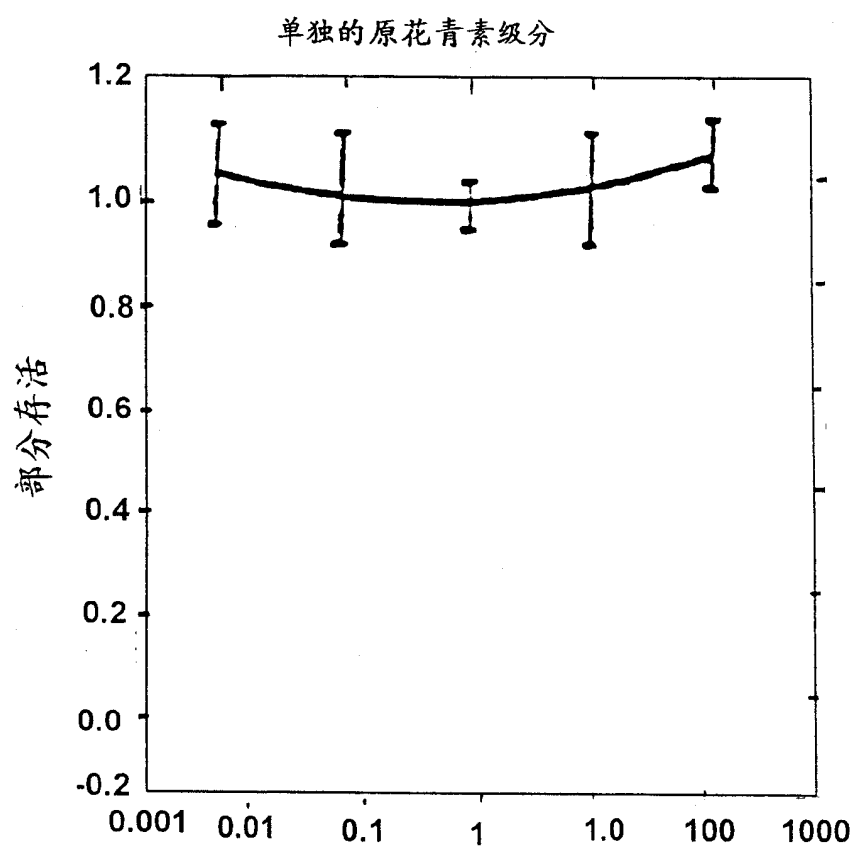


图 9 C: 可可原花青素级分和HCT-116细胞系
之间的剂量-反应关系

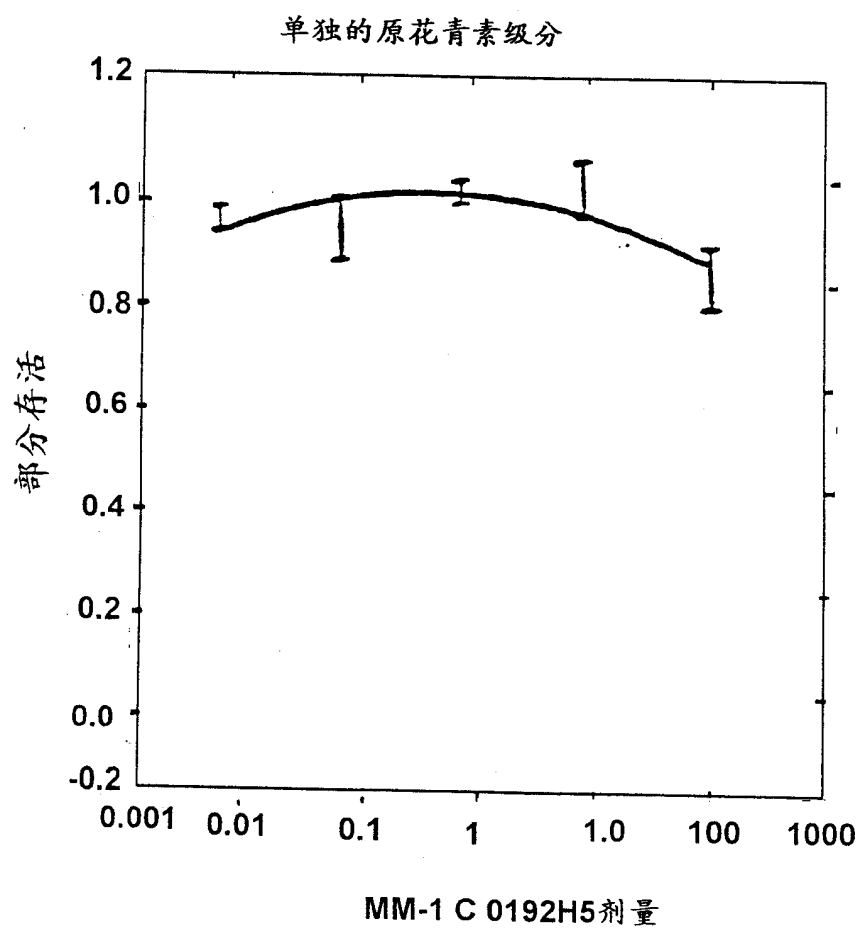


图 9D : 可可原花青素级分和HCT-116细胞系
之间的剂量-反应关系

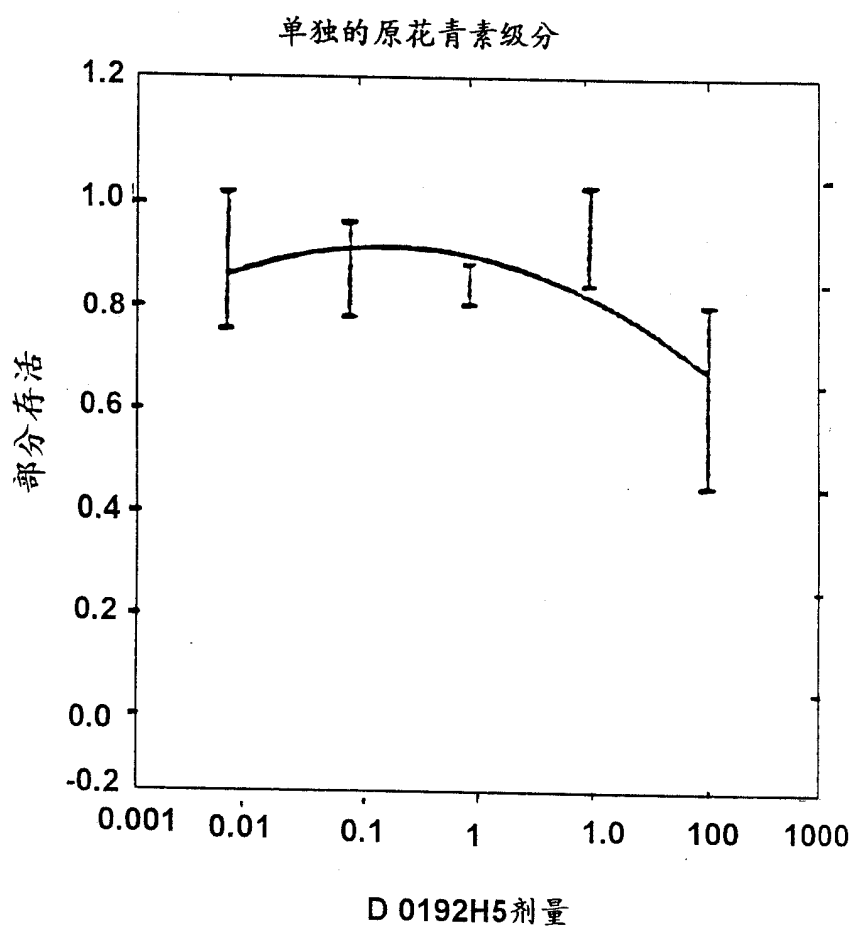


图 9E：可可原花青素级分和HCT-116细胞系
之间的剂量-反应关系

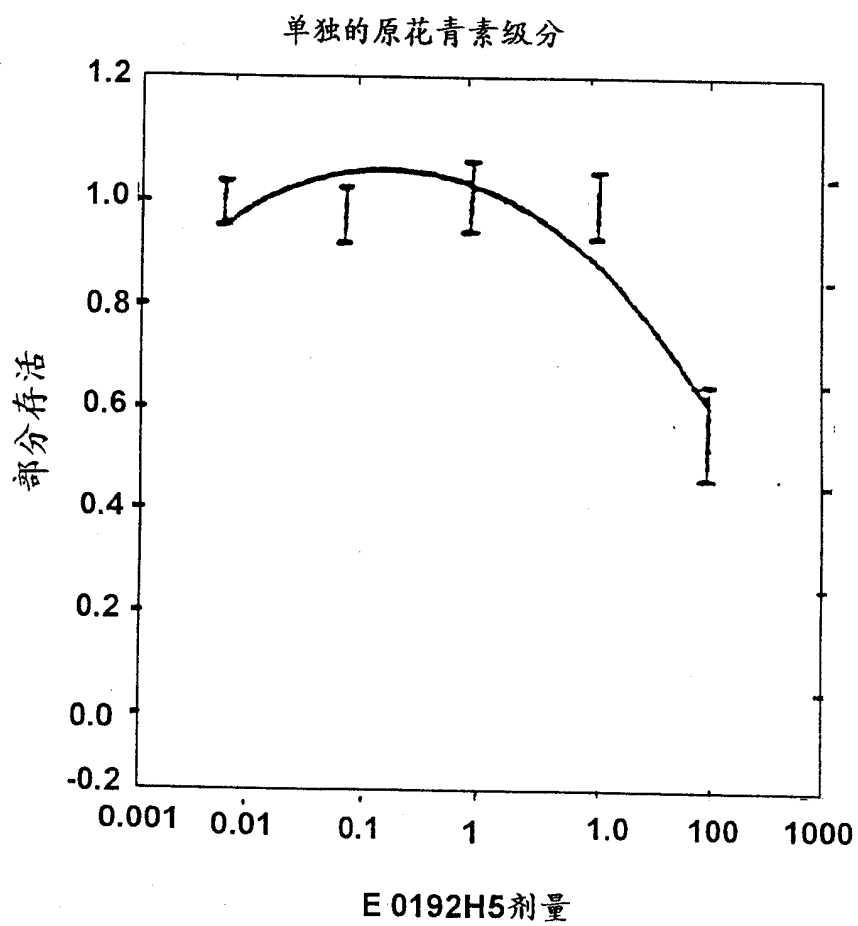


图 9 F: 可可原花青素级分和HCT-116细胞系
之间的剂量-反应关系

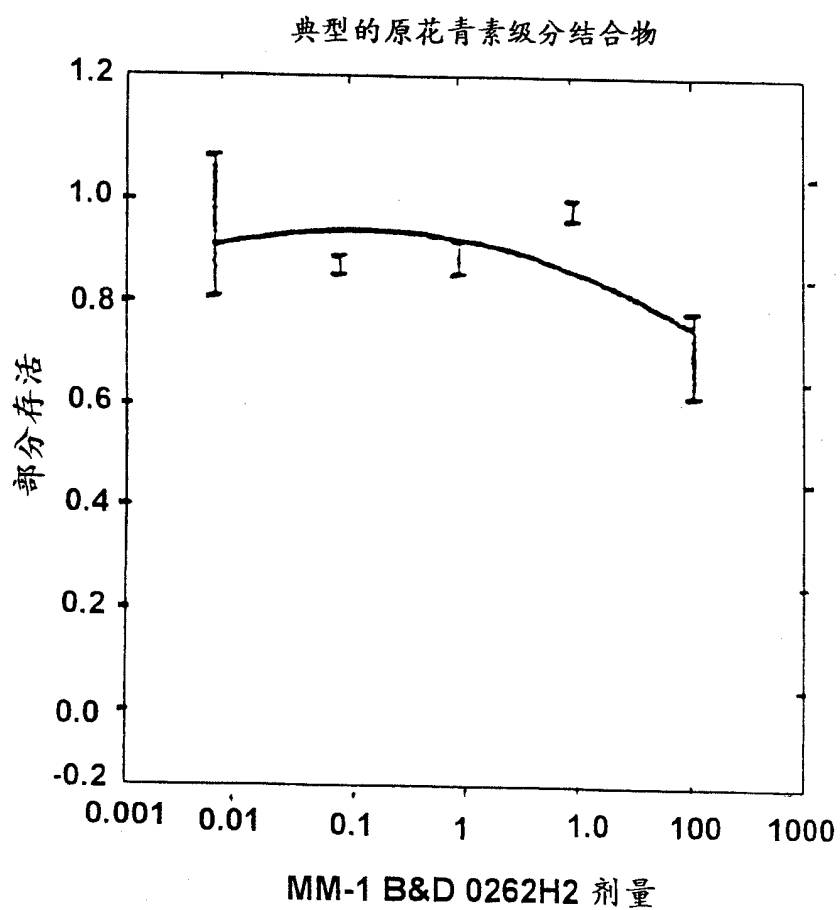


图 9 G: 可可原花青素级分和HCT-116细胞系
之间的剂量-反应关系

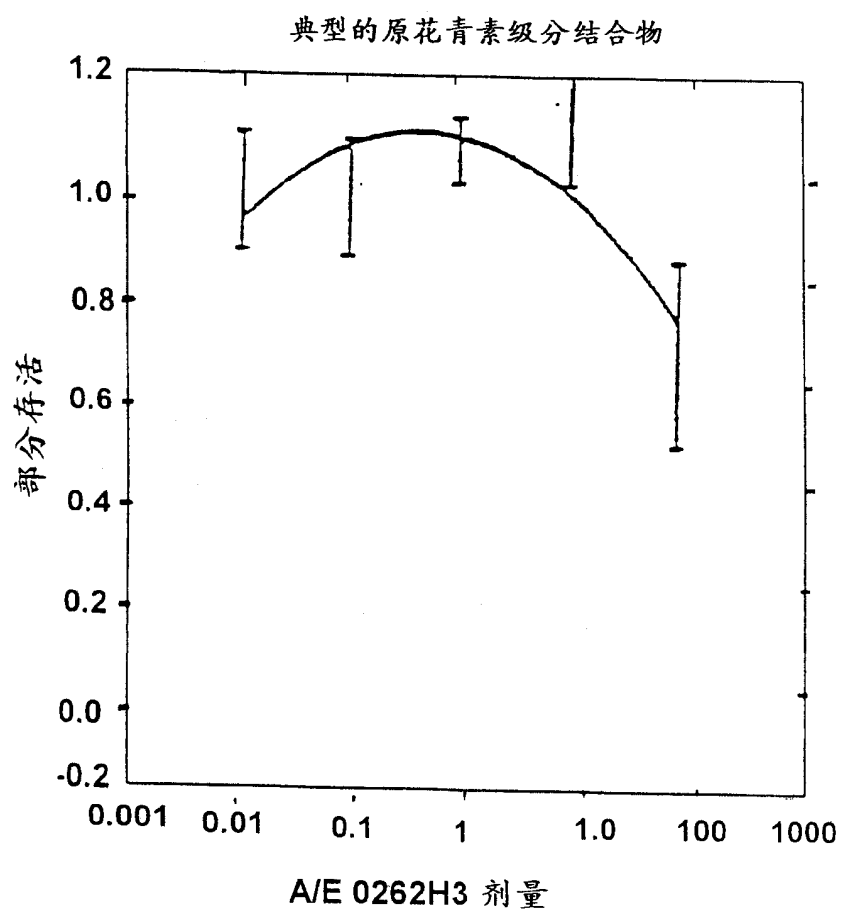


图 9 H: 可可原花青素级分和HCT-116细胞系
之间的剂量-反应关系

典型的原花青素级分结合物

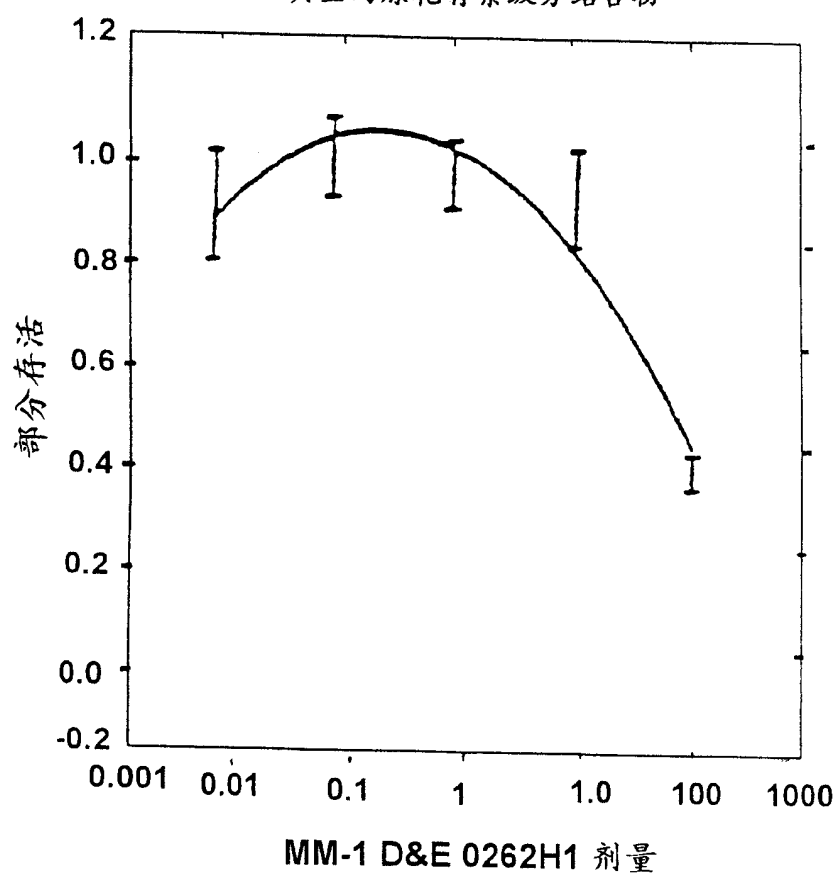


图 10 A: 可可原花青素级分和ACHN肾细胞系
之间的剂量-反应关系

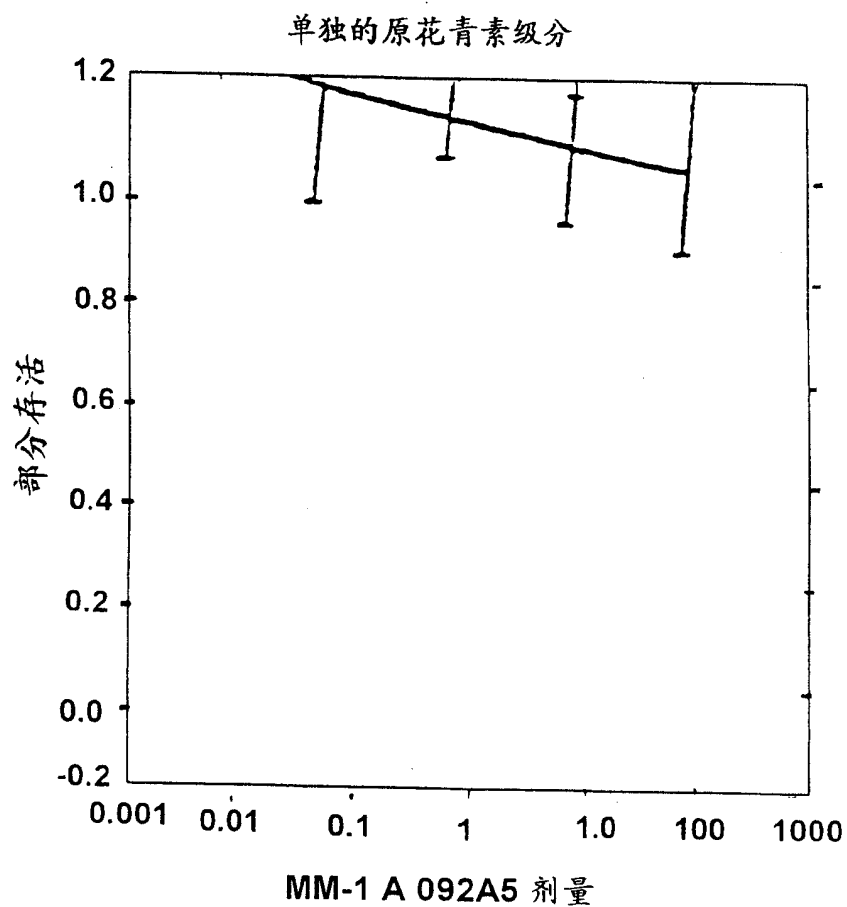


图 10 B: 可可原花青素级分和ACHN肾细胞系
之间的剂量-反应关系

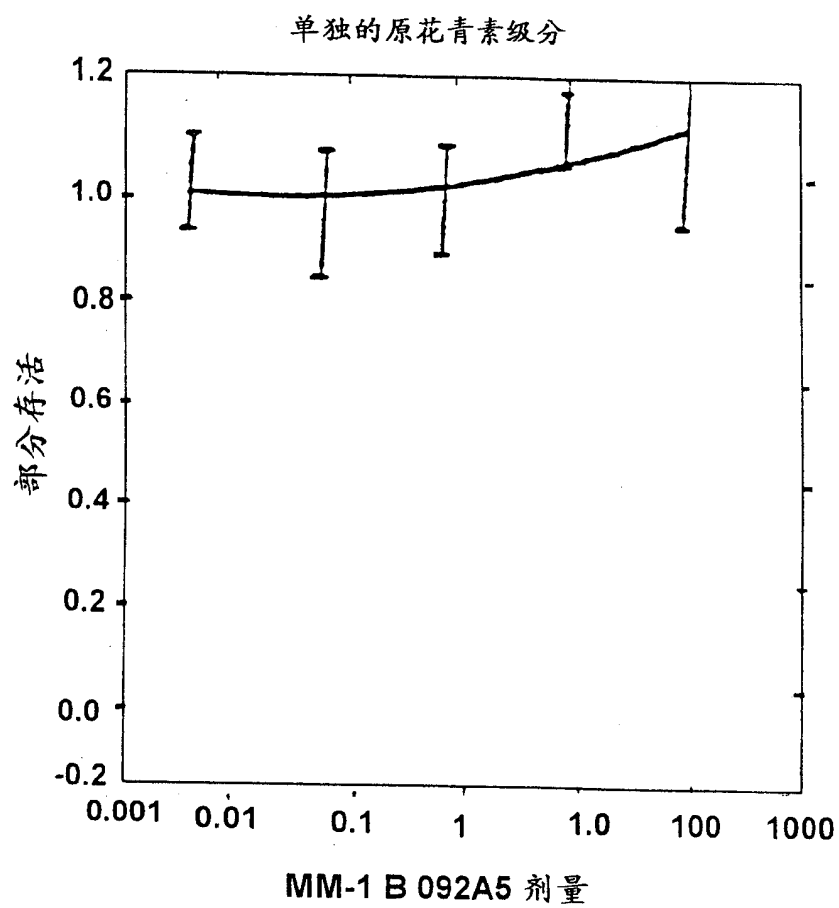


图 10 C: 可可原花青素级分和ACHN肾细胞系
之间的剂量-反应关系

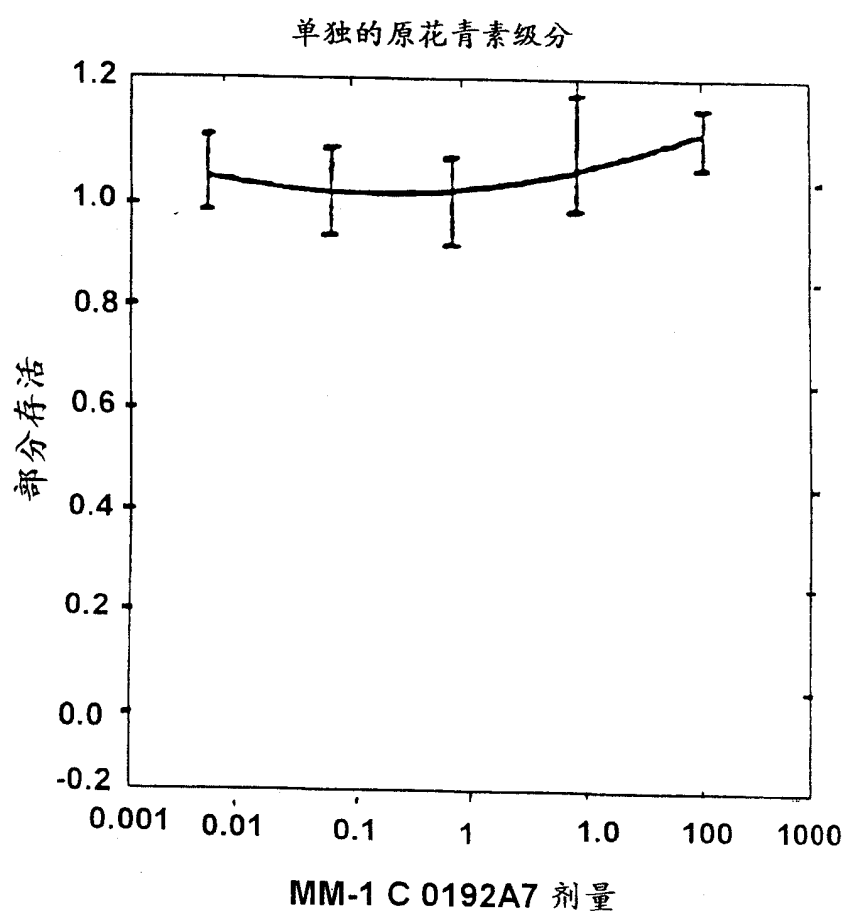


图 10 D: 可可原花青素级分和ACHN肾细胞系
之间的剂量-反应关系

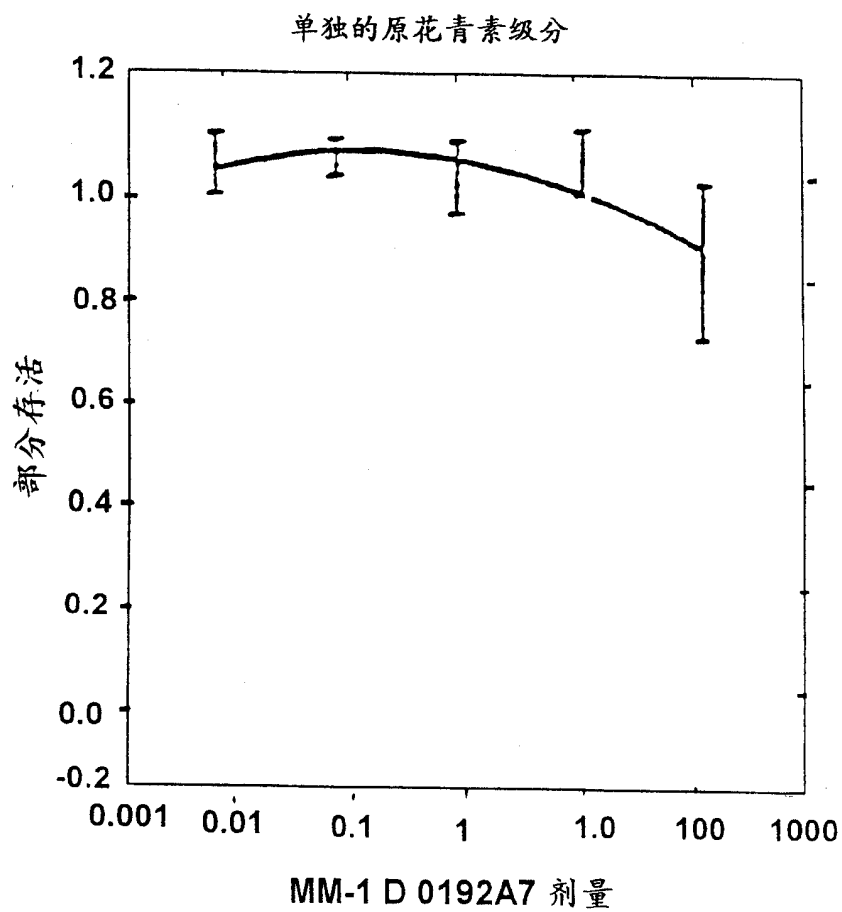


图 10 E: 可可原花青素级分和ACHN肾细胞系
之间的剂量-反应关系

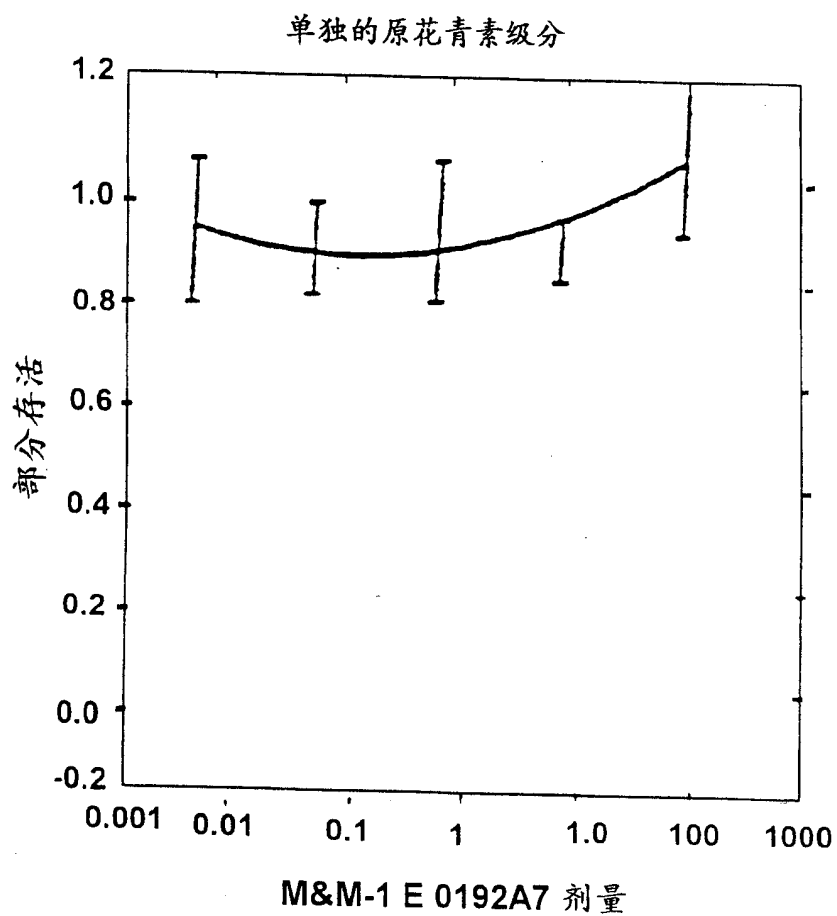


图 10 F: 可可原花青素级分和ACHN肾细胞系
之间的剂量-反应关系

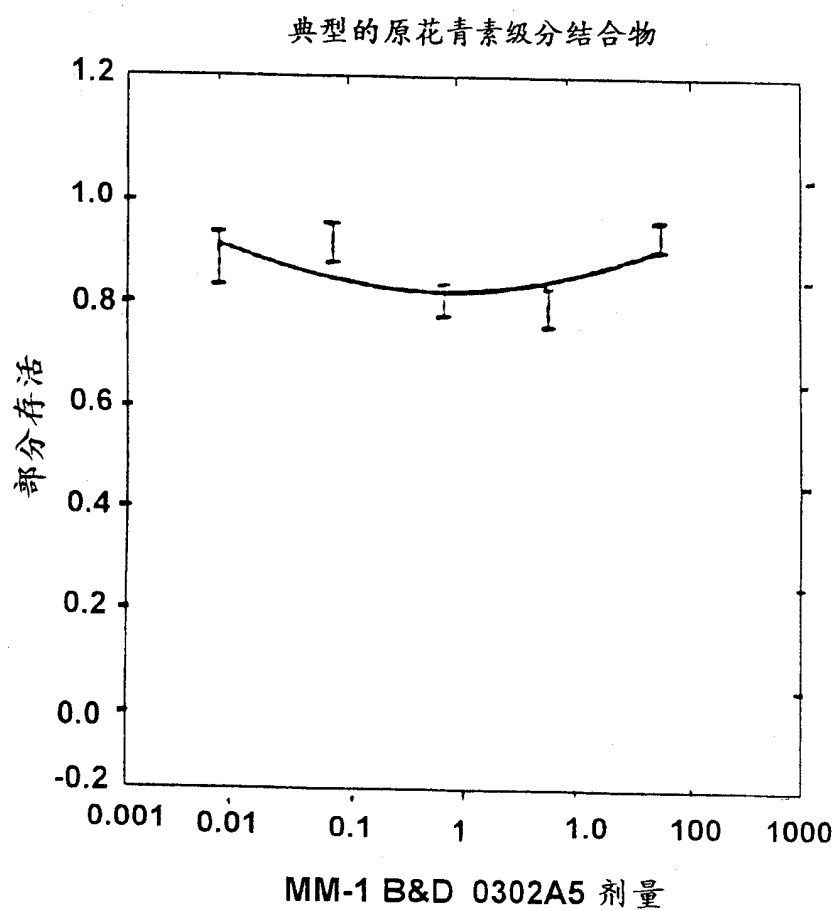


图 10 G: 可可原花青素级分和ACHN肾细胞系
之间的剂量-反应关系

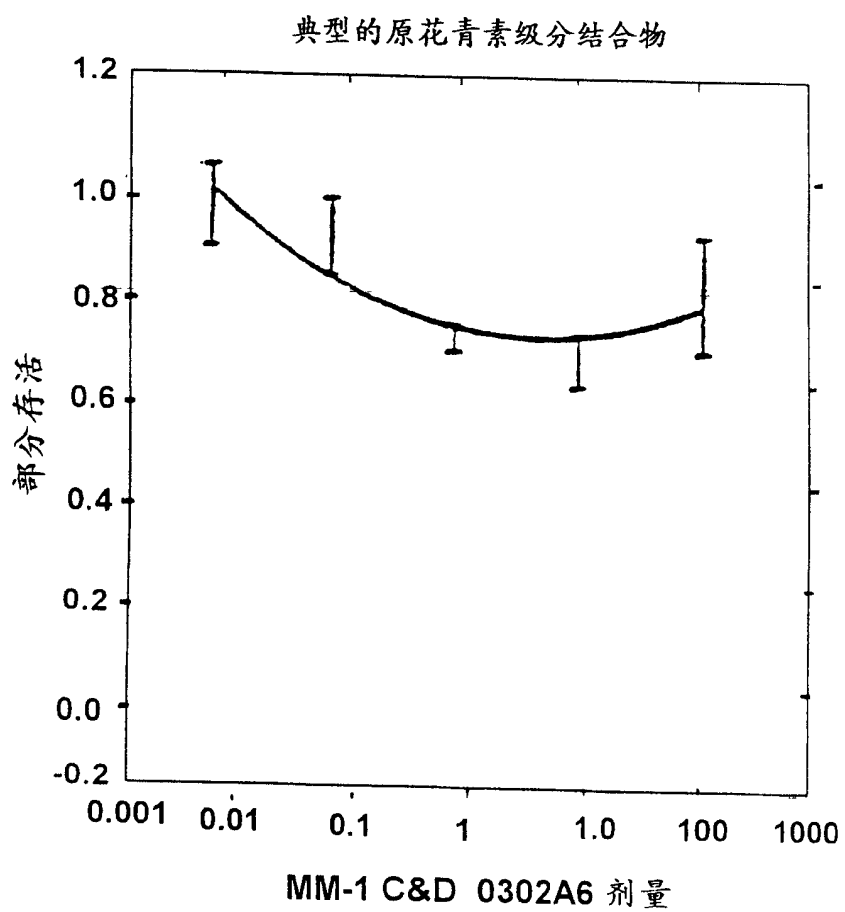


图 10 H: 可可原花青素级分和ACHN肾细胞系
之间的剂量-反应关系

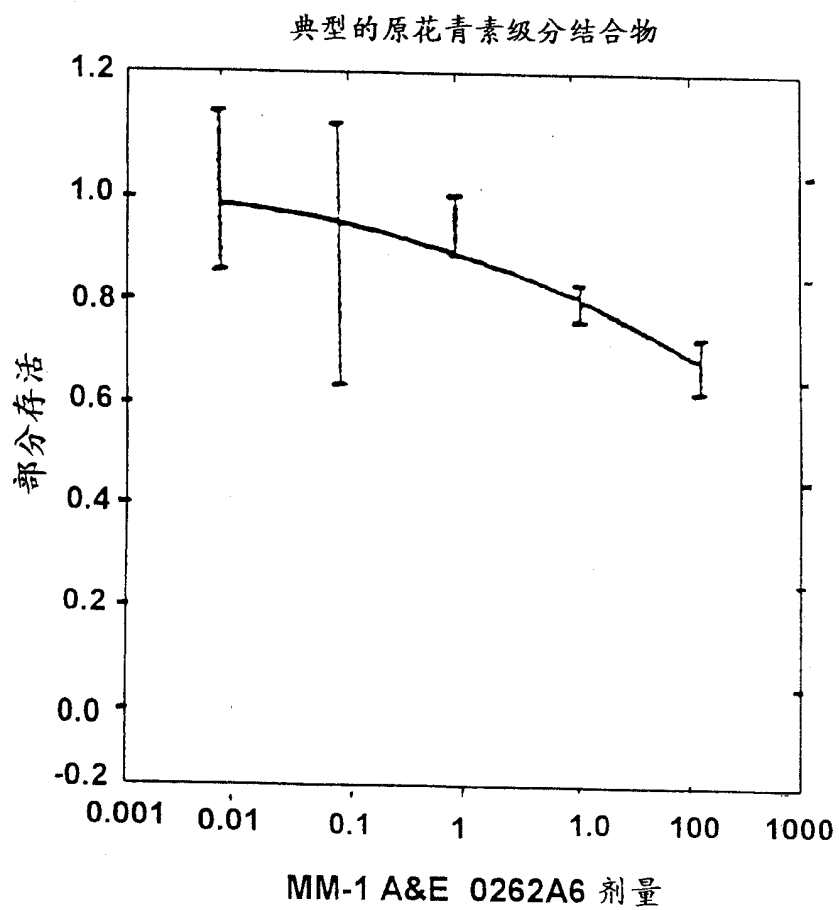


图 11 A: 可可原花青素级分和A-549肺细胞系
之间的剂量-反应关系

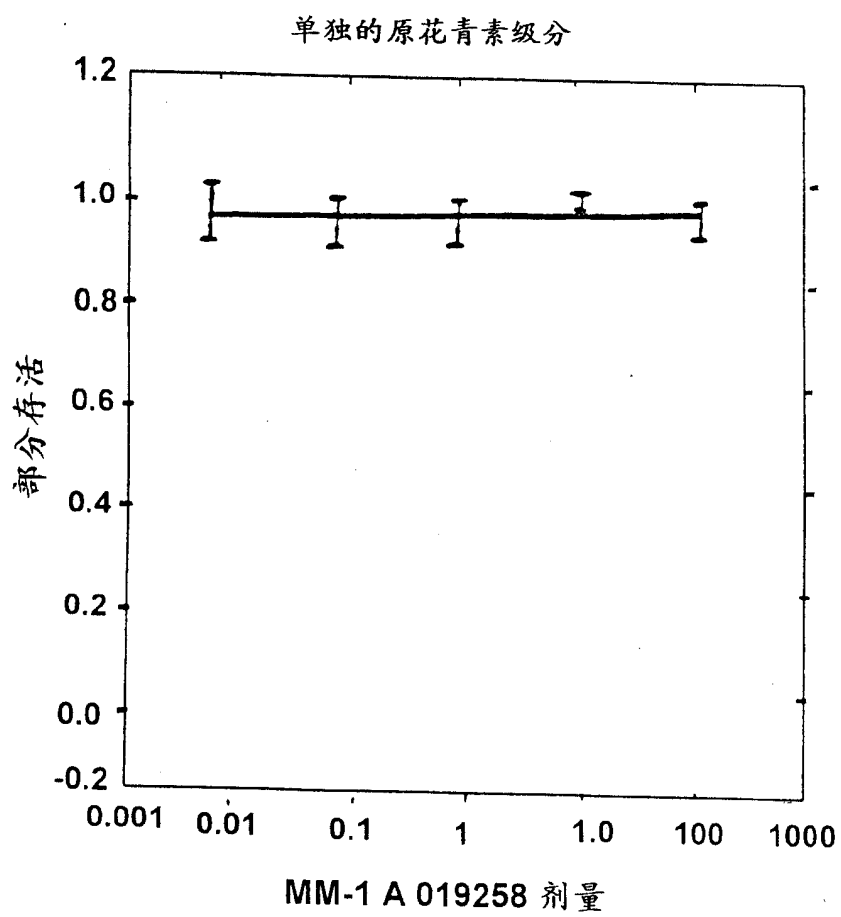


图 11 B: 可可原花青素级分和A-549肺细胞系
之间的剂量-反应关系

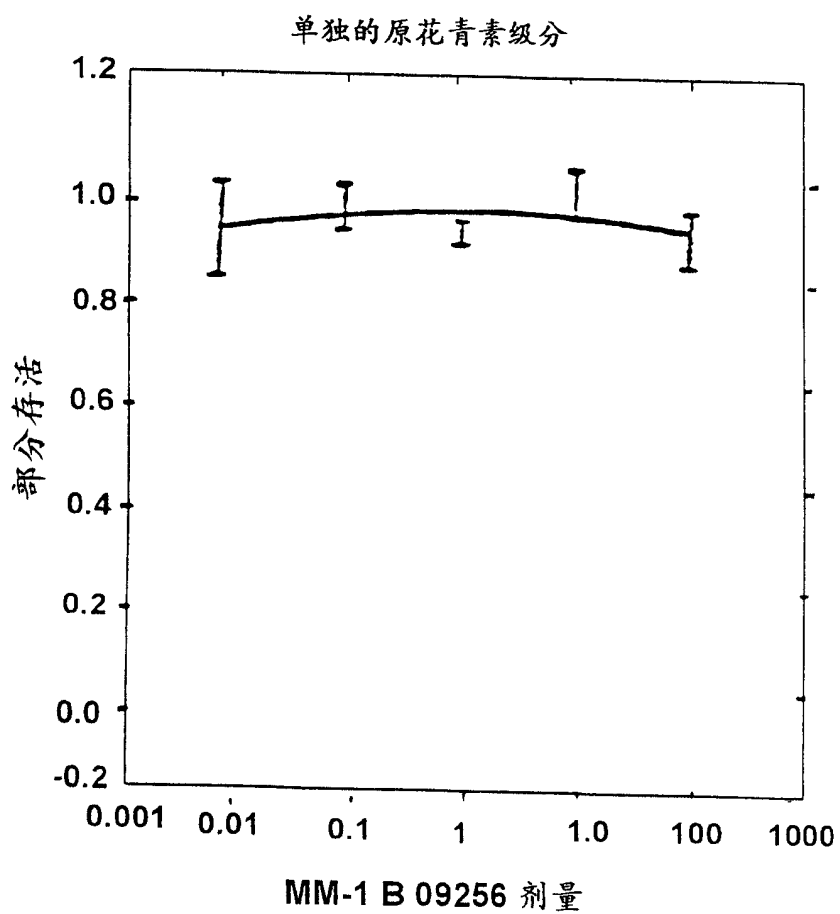


图 11 C: 可可原花青素级分和A-549肺细胞系
之间的剂量-反应关系

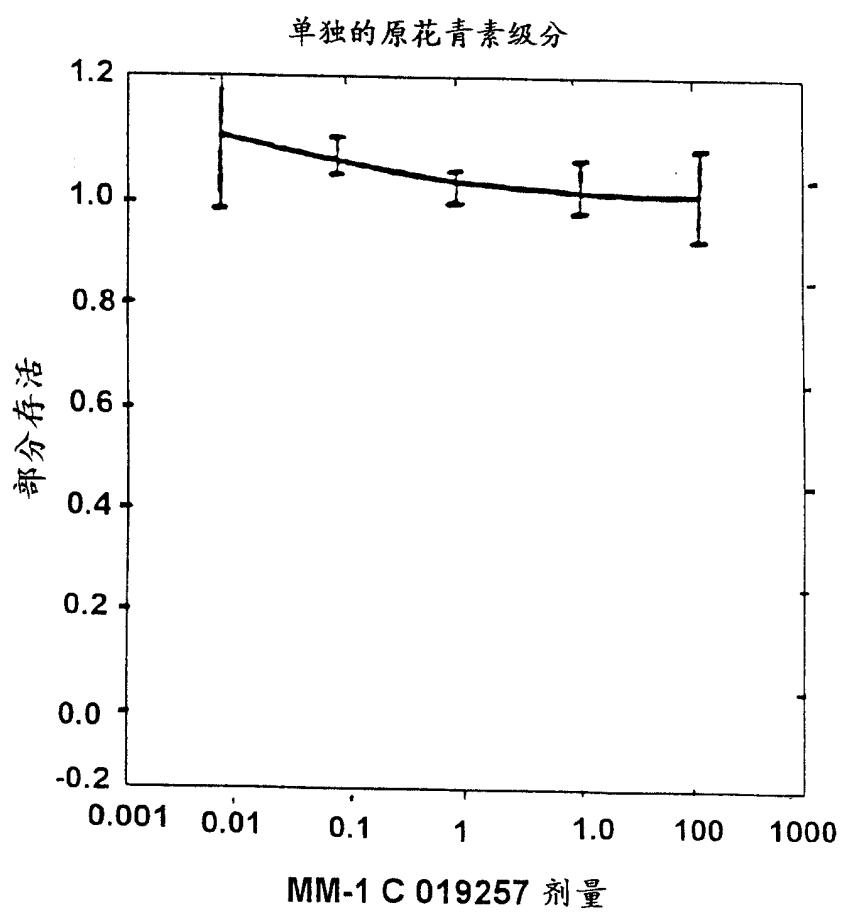


图 11 D: 可可原花青素级分和A-549肺细胞系
之间的剂量-反应关系

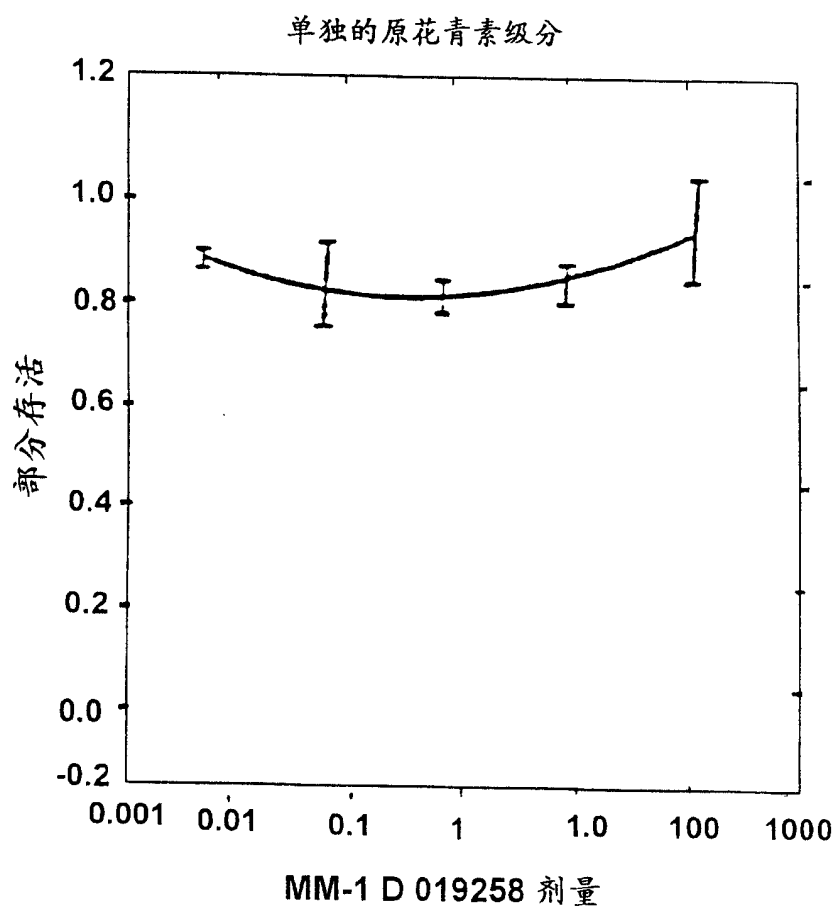


图 11 E: 可可原花青素级分和A-549肺细胞系
之间的剂量-反应关系

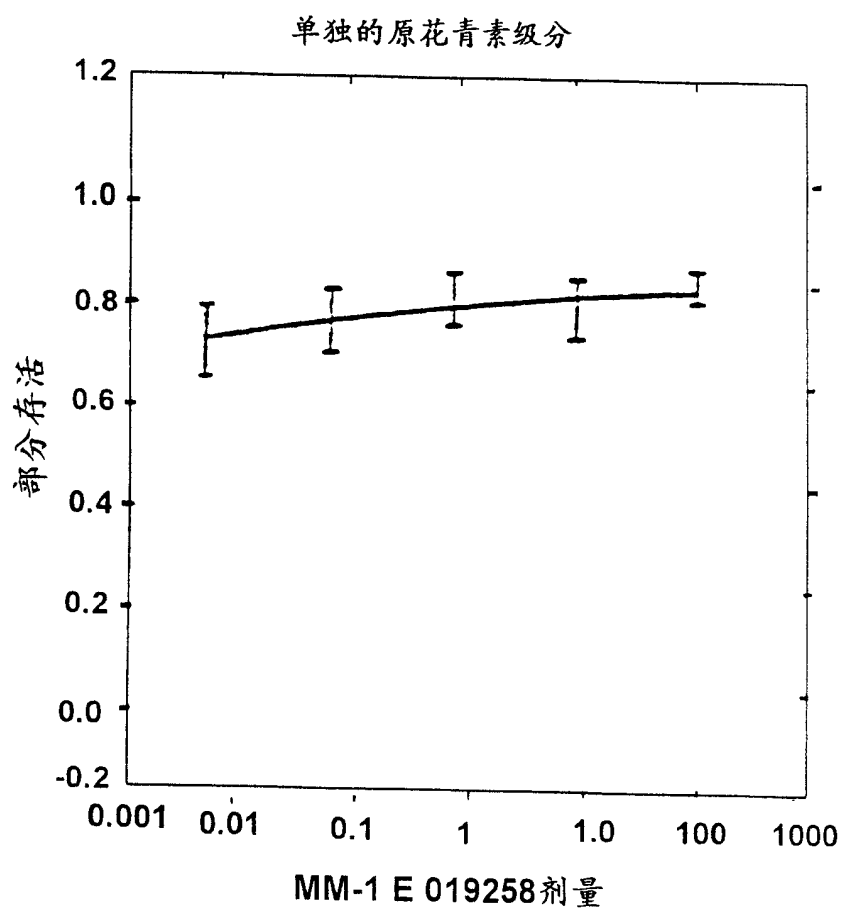


图 11 F: 可可原花青素级分和A-549肺细胞系
之间的剂量-反应关系

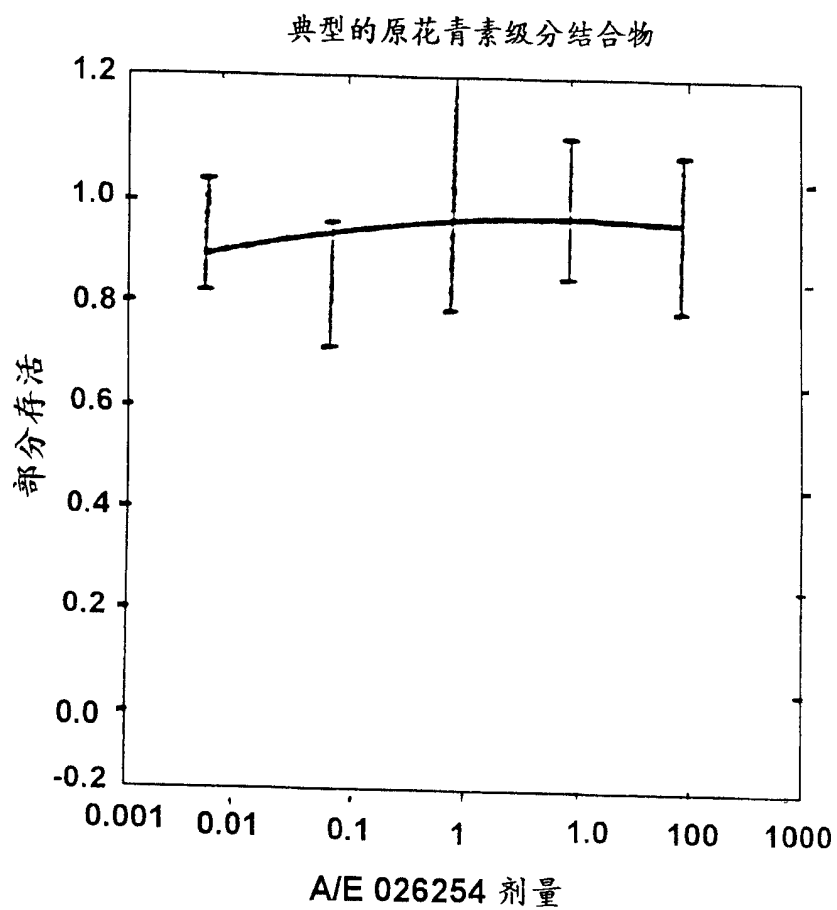


图 11 G: 可可原花青素级分和A-549肺细胞系
之间的剂量-反应关系

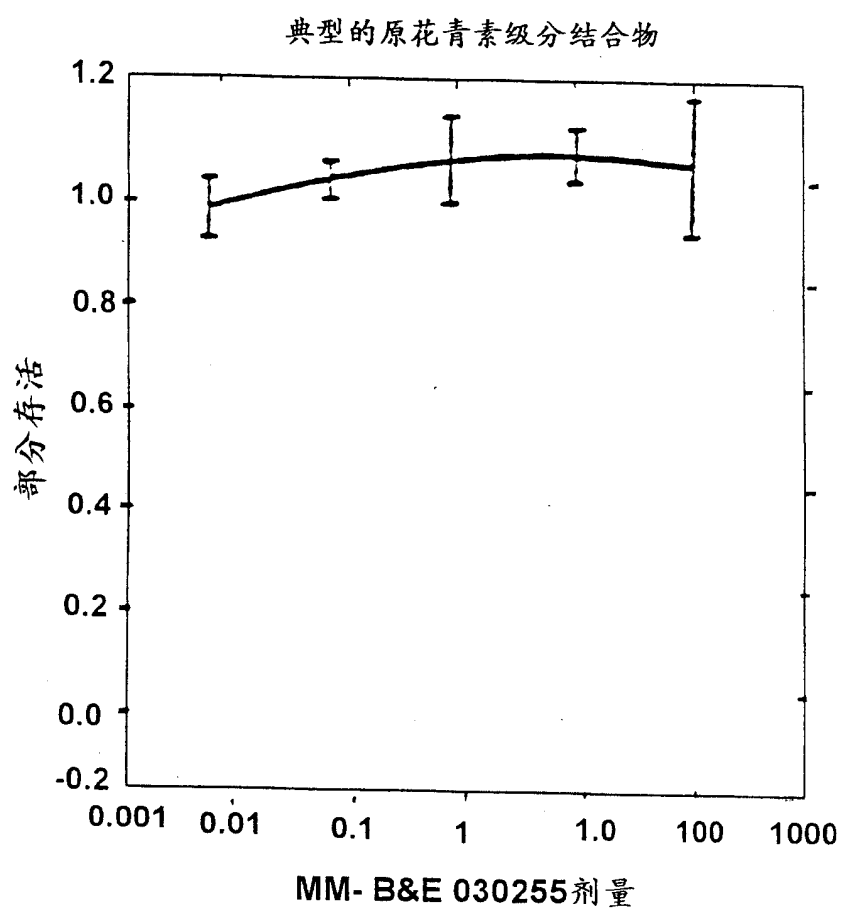


图 11 H: 可可原花青素级分和A-549肺细胞系
之间的剂量-反应关系

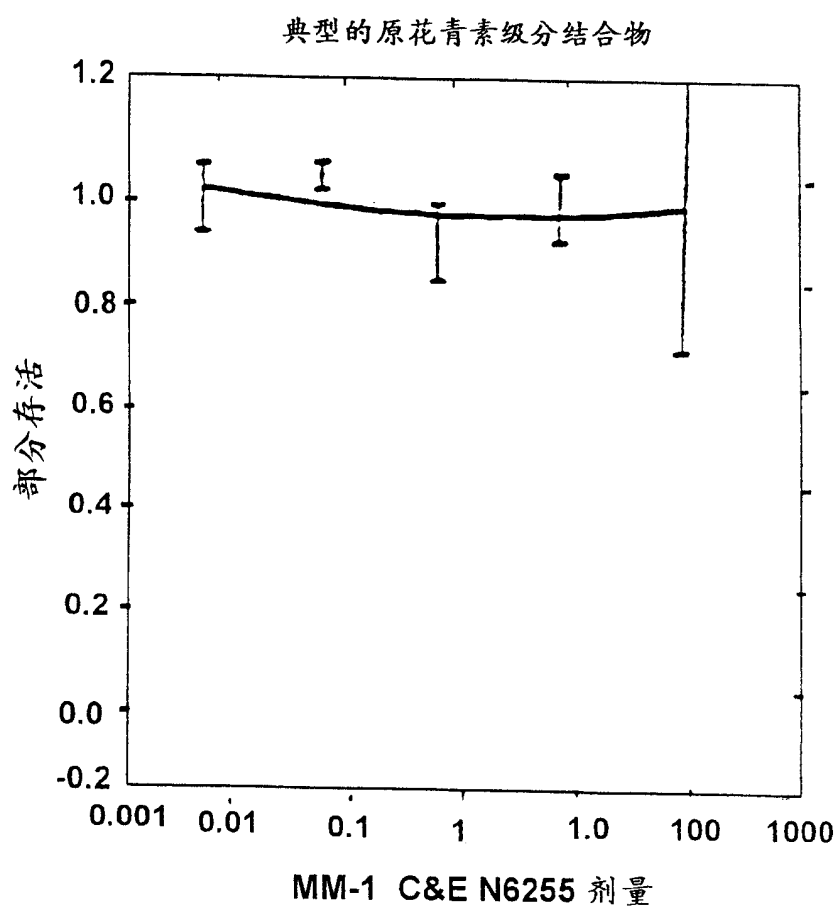


图 12 A: 可可原花青素级分和SK-5黑色素瘤细胞系之间的剂量-反应关系

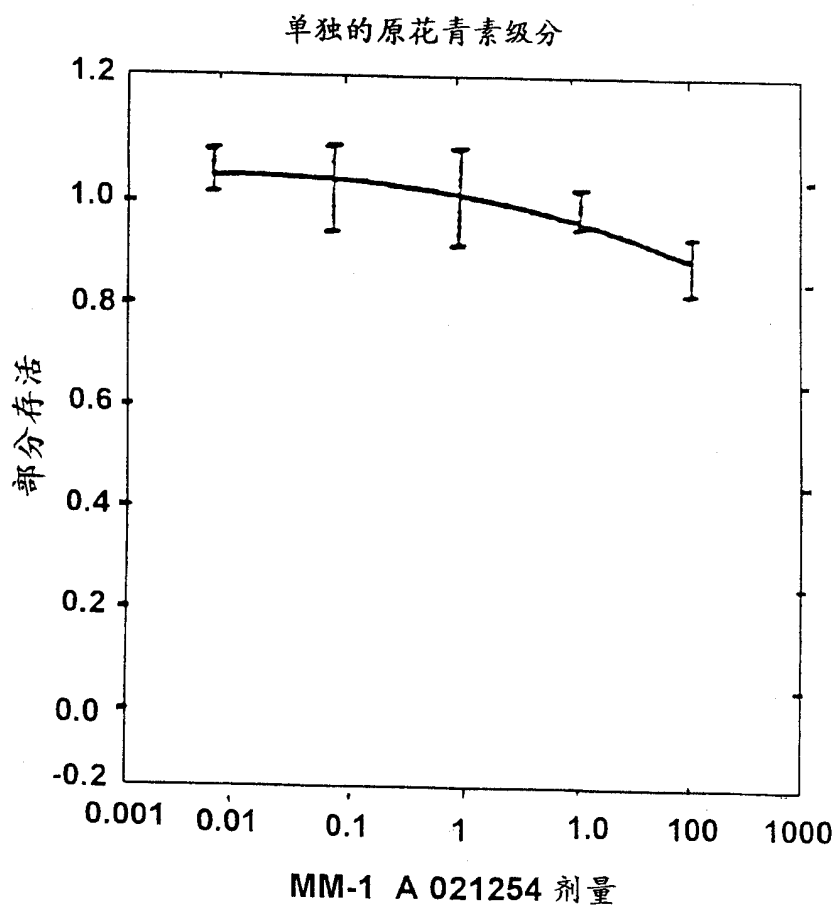


图 12 B: 可可原花青素级分和SK-5黑色素瘤细胞系之间的剂量-反应关系

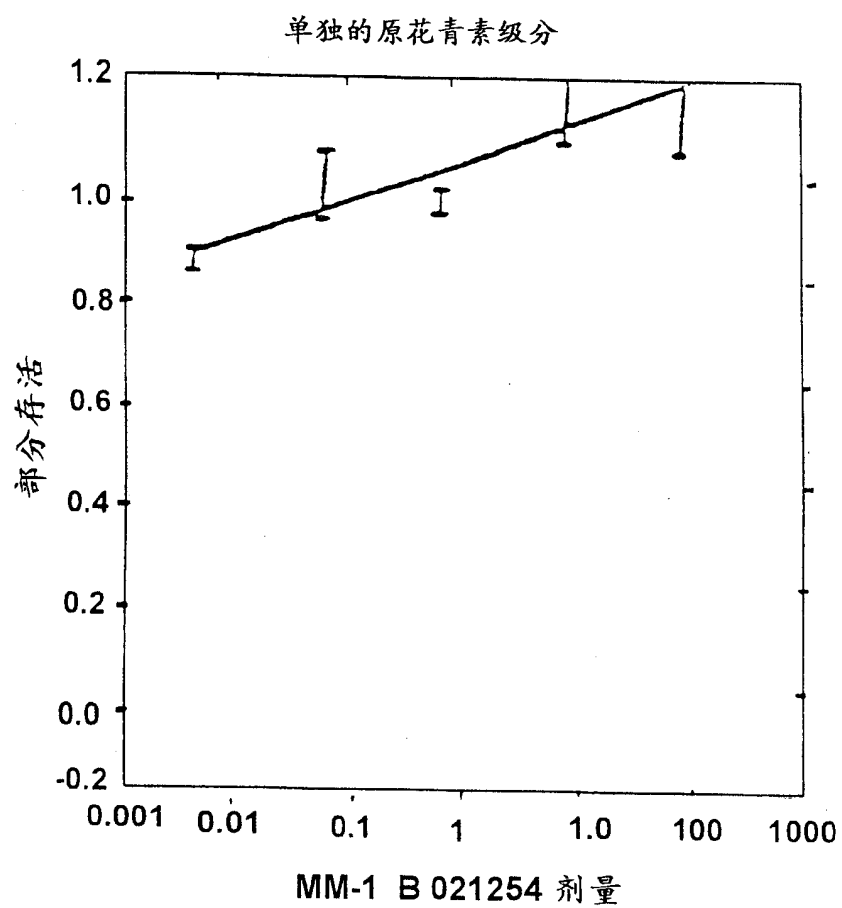


图 12 C: 可可原花青素级分和SK-5黑色素瘤细胞系之间的剂量-反应关系

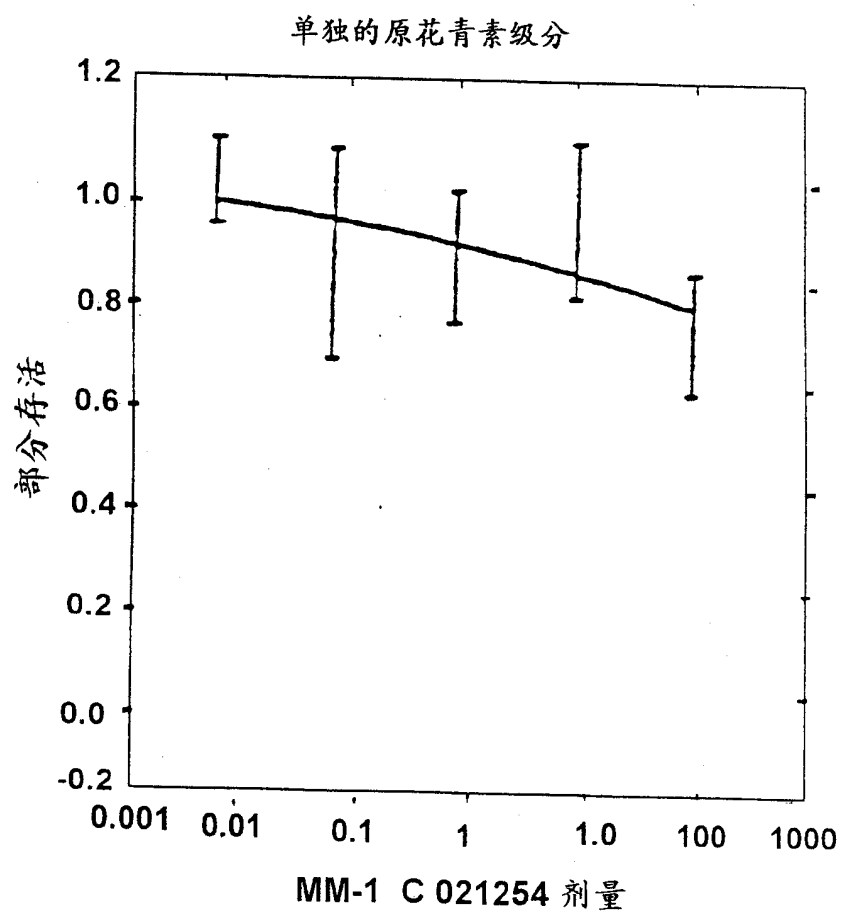


图 12 D: 可可原花青素级分和SK-5黑色素瘤
细胞系之间的剂量-反应关系

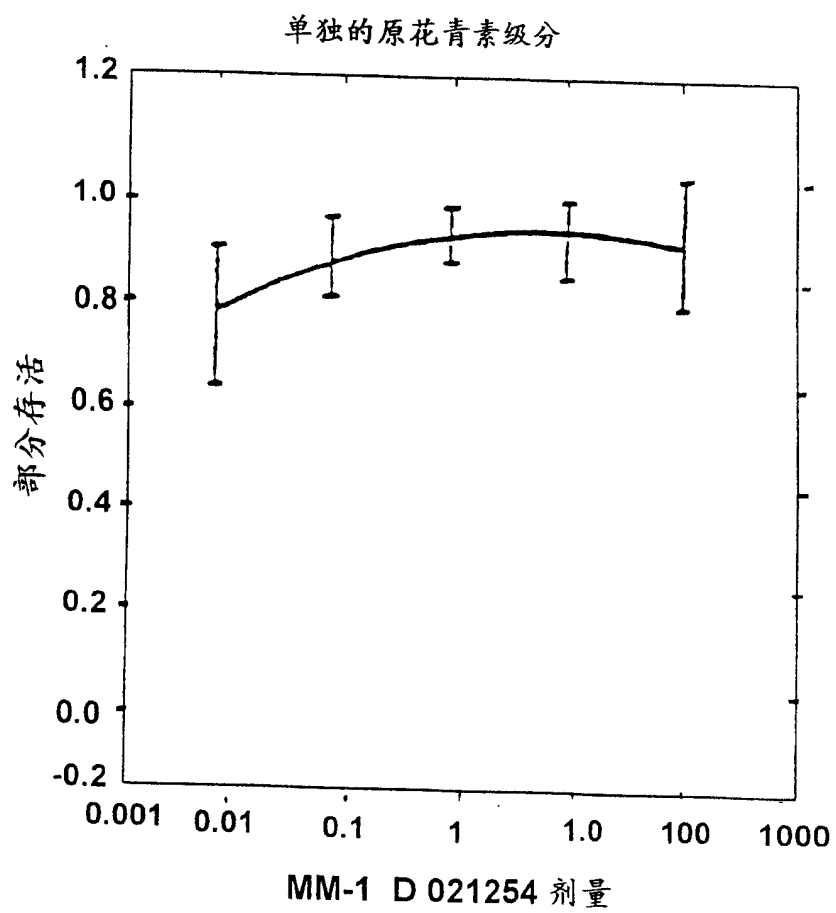


图 12 E: 可可原花青素级分和SK-5黑色素瘤
细胞系之间的剂量-反应关系

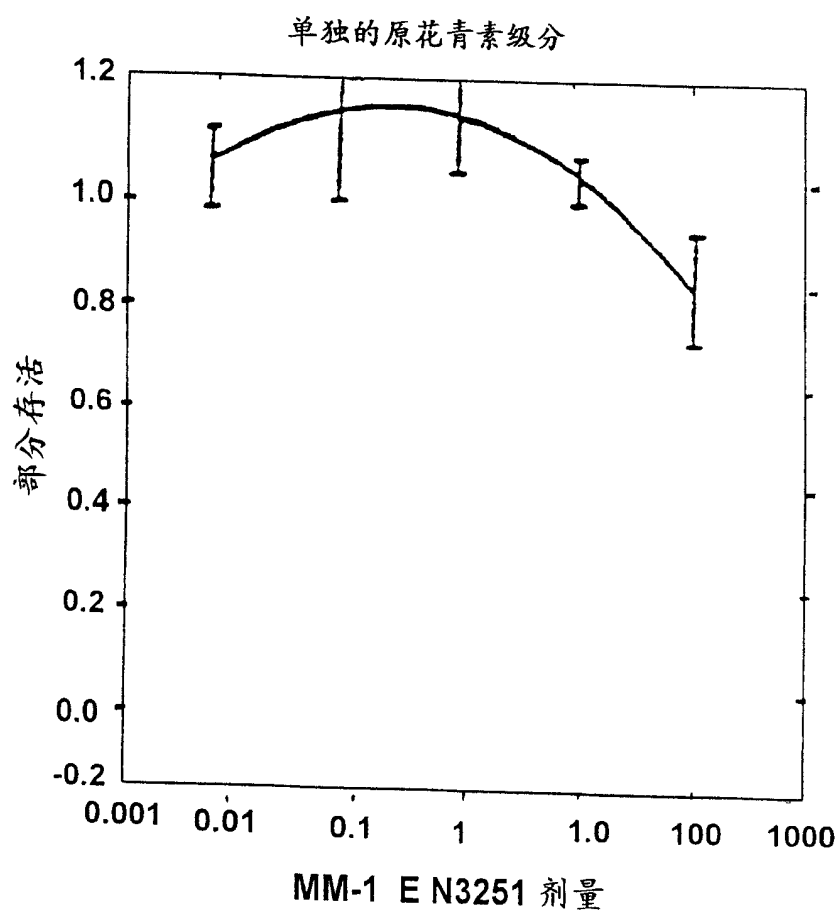


图 12 F: 可可原花青素级分和SK-5黑色素瘤细胞系之间的剂量-反应关系

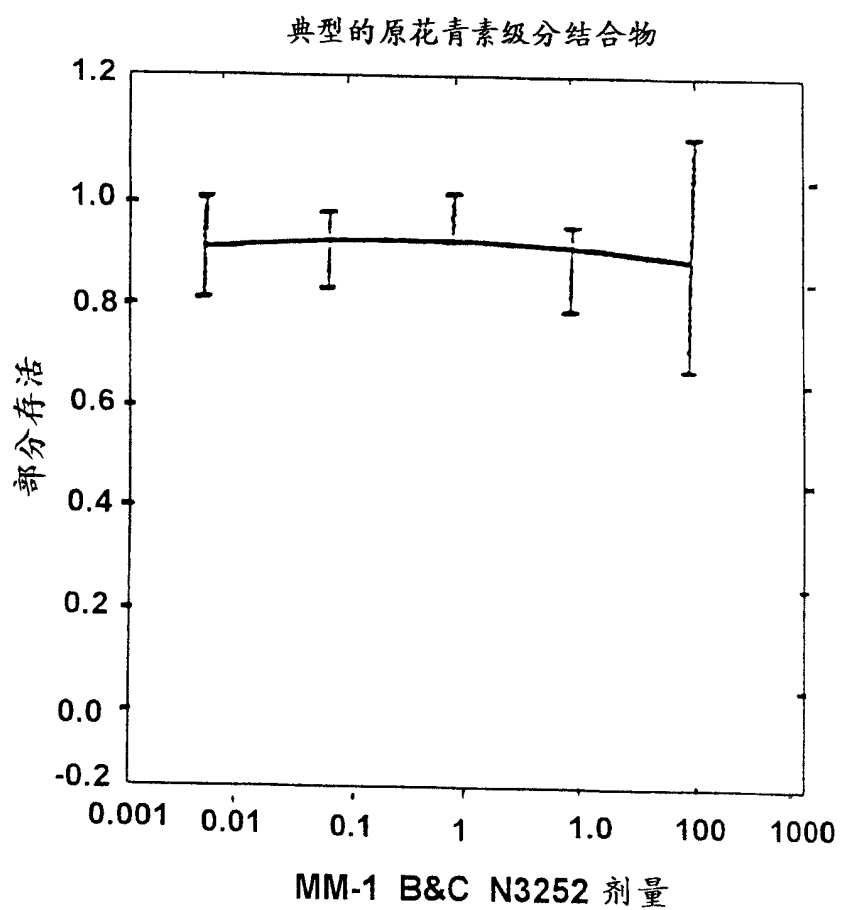


图 12 G: 可可原花青素级分和SK-5黑色素瘤
细胞系之间的剂量-反应关系

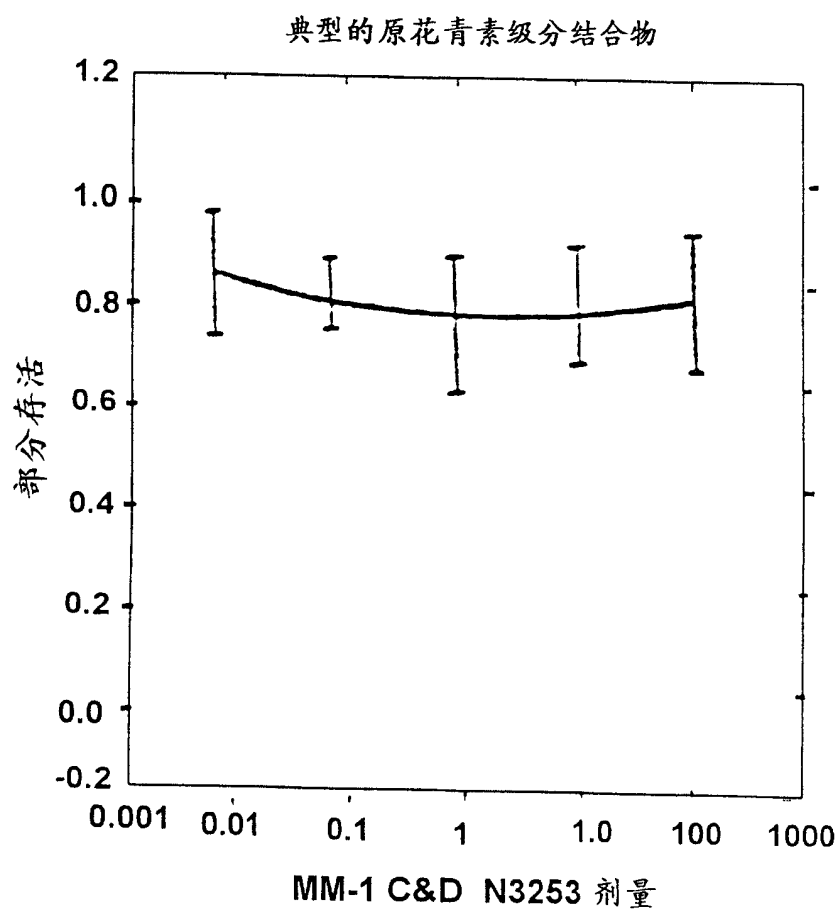


图 12 H: 可可原花青素级分和SK-5黑色素瘤
细胞系之间的剂量-反应关系

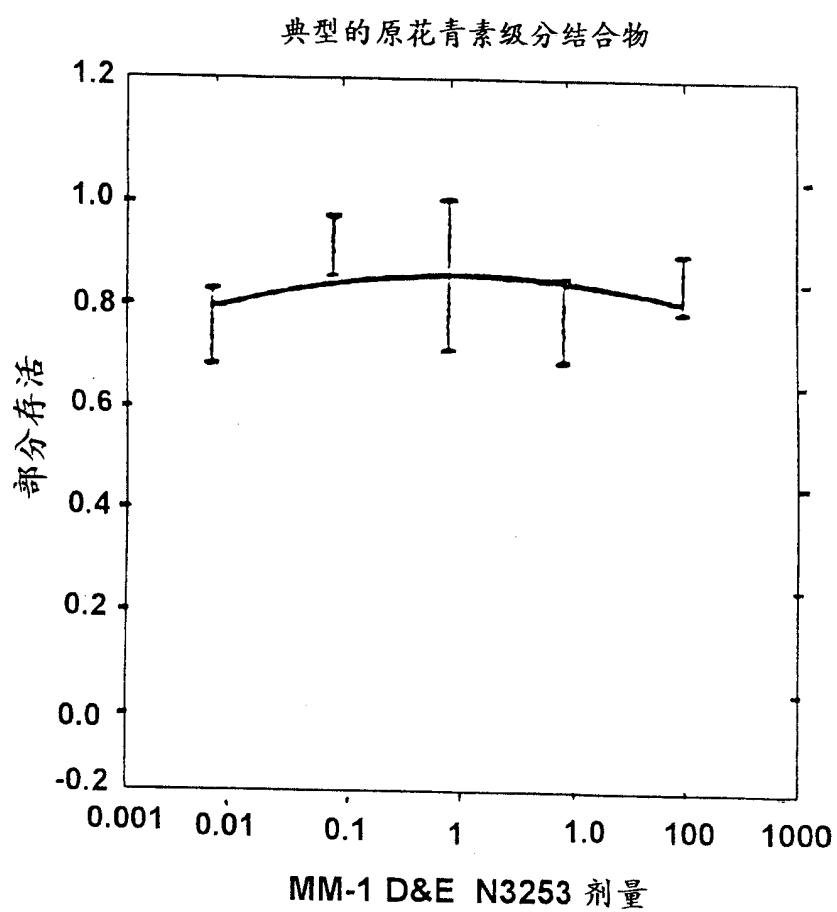


图 13 A: 可可原花青素级分和MCF-7乳腺
细胞系之间的剂量-反应关系

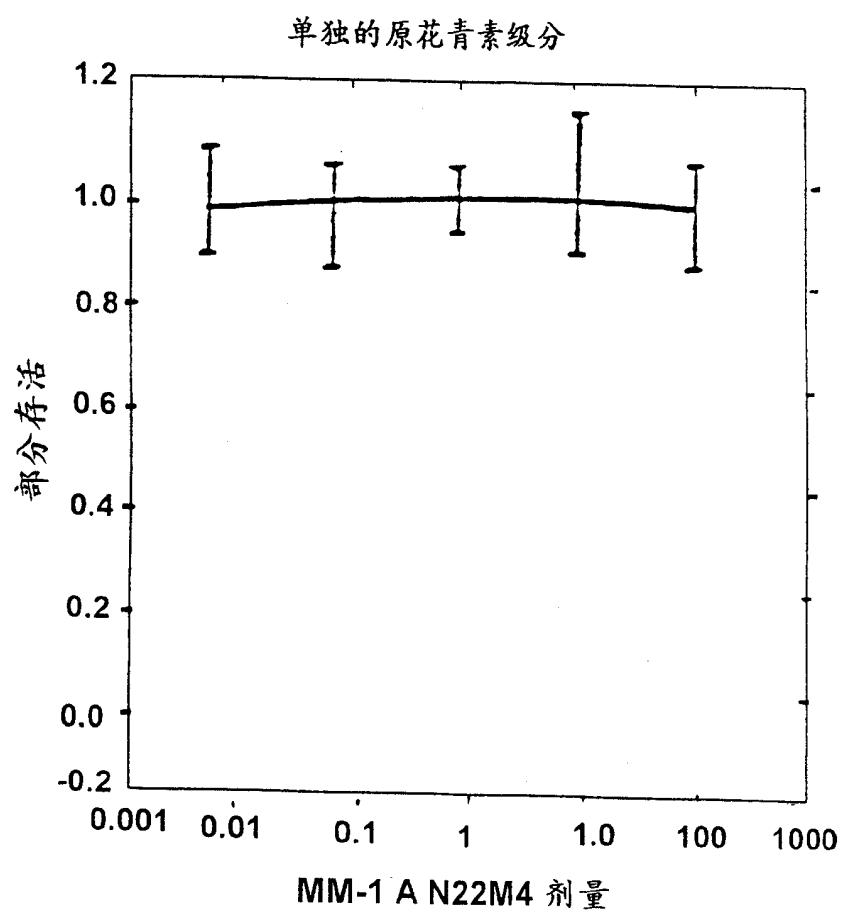


图 13 B: 可可原花青素级分和MCF-7乳腺
细胞系之间的剂量-反应关系

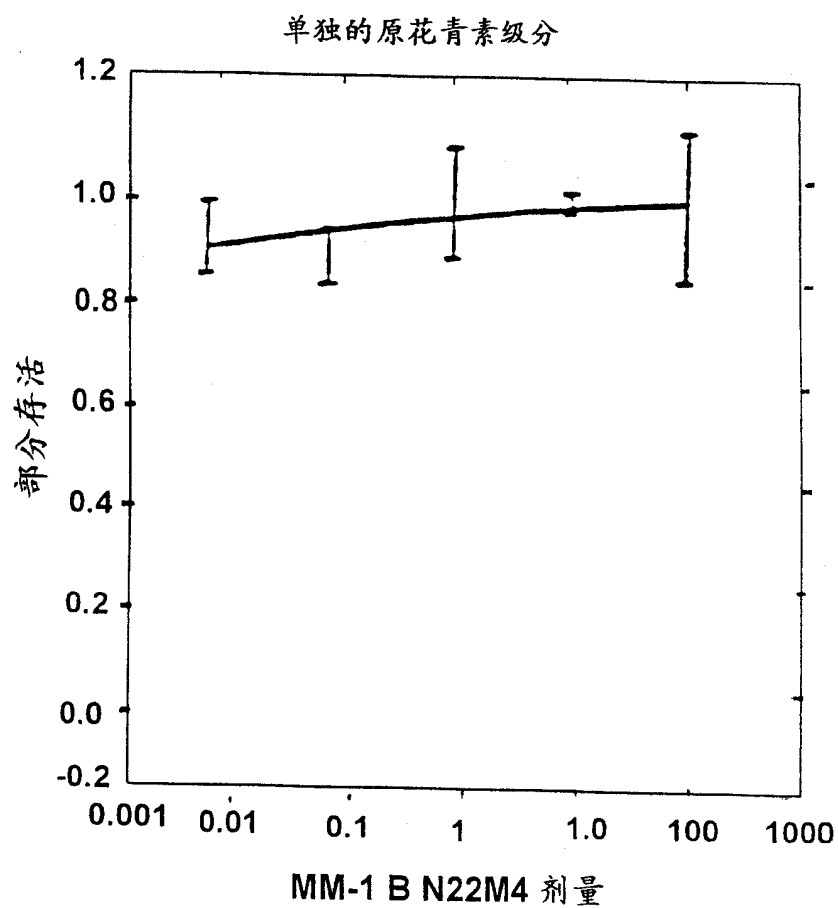


图 13 C: 可可原花青素级分和MCF-7乳腺癌
细胞系之间的剂量-反应关系

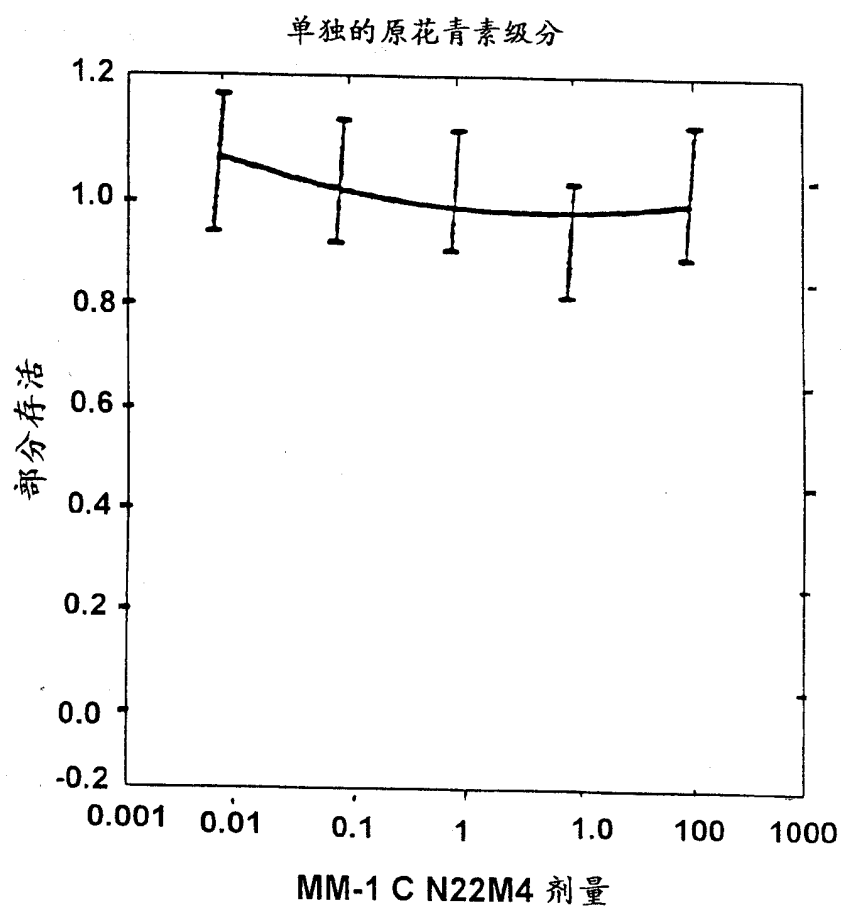


图 13 D: 可可原花青素级分和MCF-7乳腺
细胞系之间的剂量-反应关系

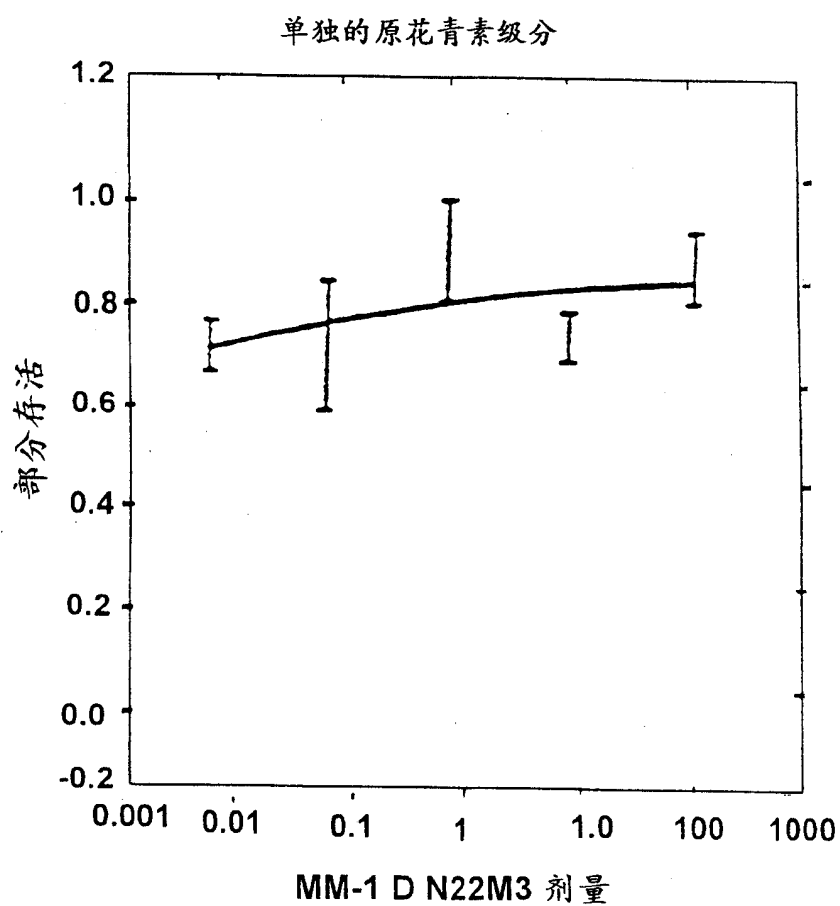


图 13 E: 可可原花青素级分和MCF-7乳腺
细胞系之间的剂量-反应关系

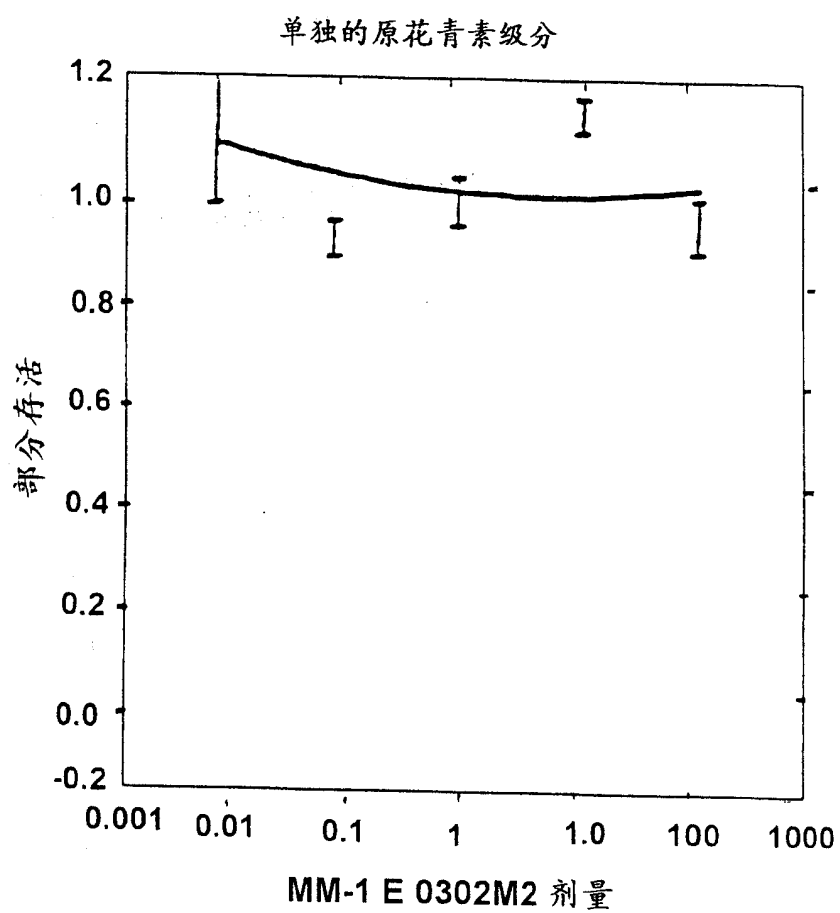


图 13 F: 可可原花青素级分和MCF-7乳腺
细胞系之间的剂量-反应关系

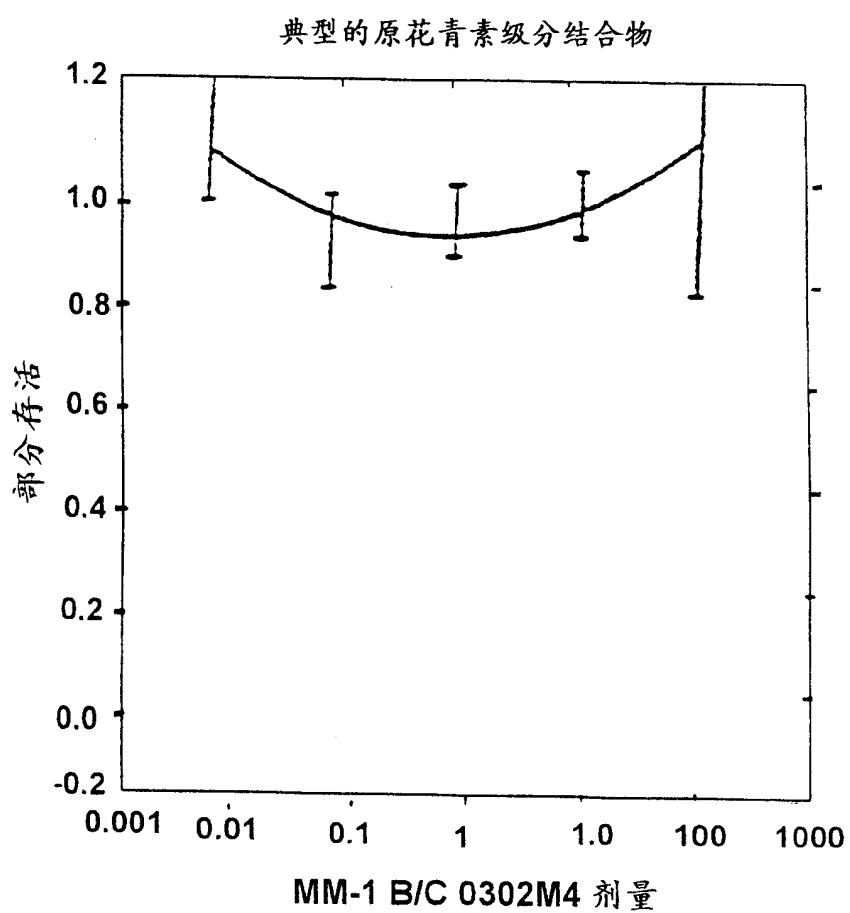


图 13 G: 可可原花青素级分和MCF-7乳腺
细胞系之间的剂量-反应关系

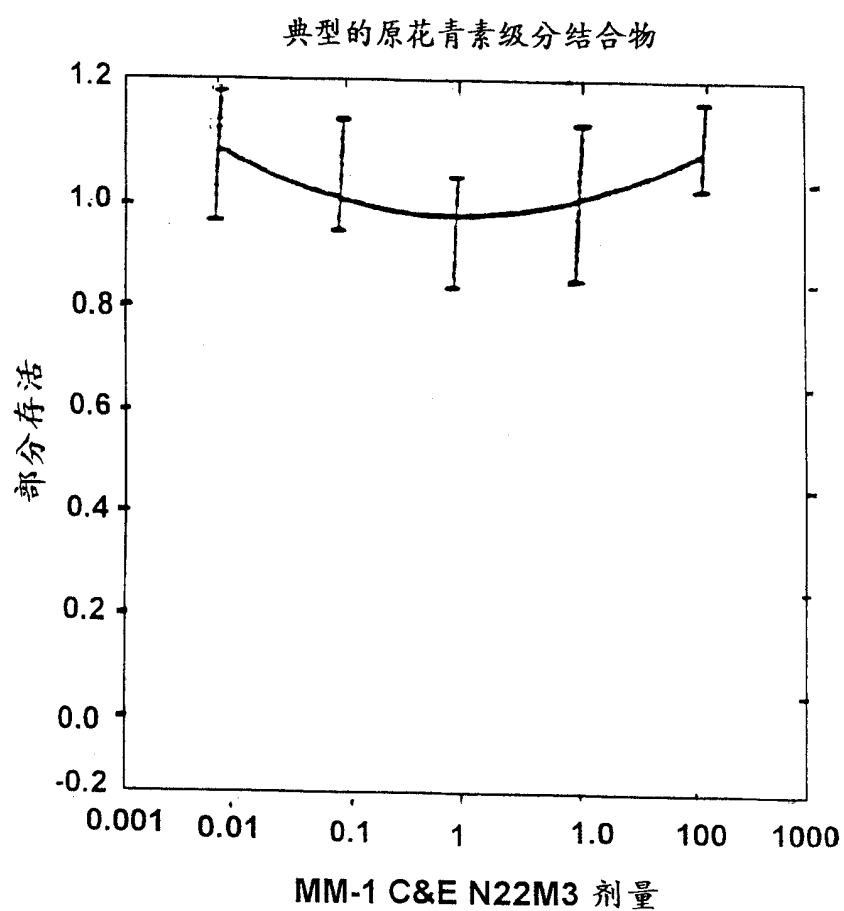
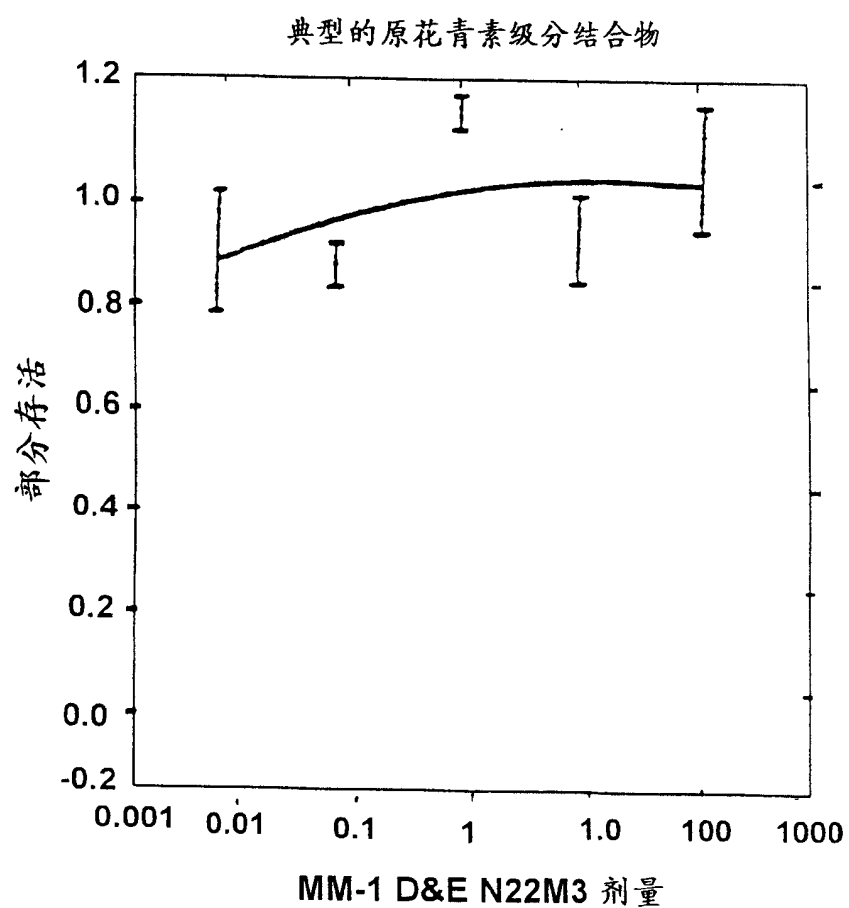


图 13 H: 可可原花青素级分和MCF-7乳腺
细胞系之间的剂量-反应关系



可可原花青素级分D和CCRF-CEM
T细胞白血病细胞系之间的剂量-反应关系

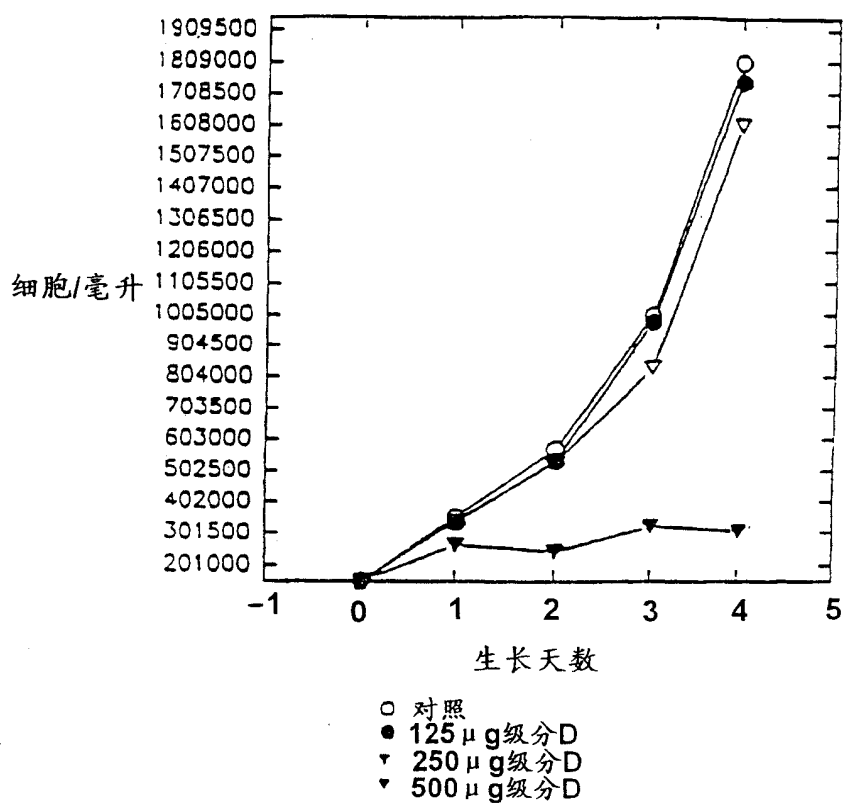


图 14

图 15 A: 用级分D+E处理的MCF-7 p168细胞的XTT和结晶紫细胞毒检测的比较

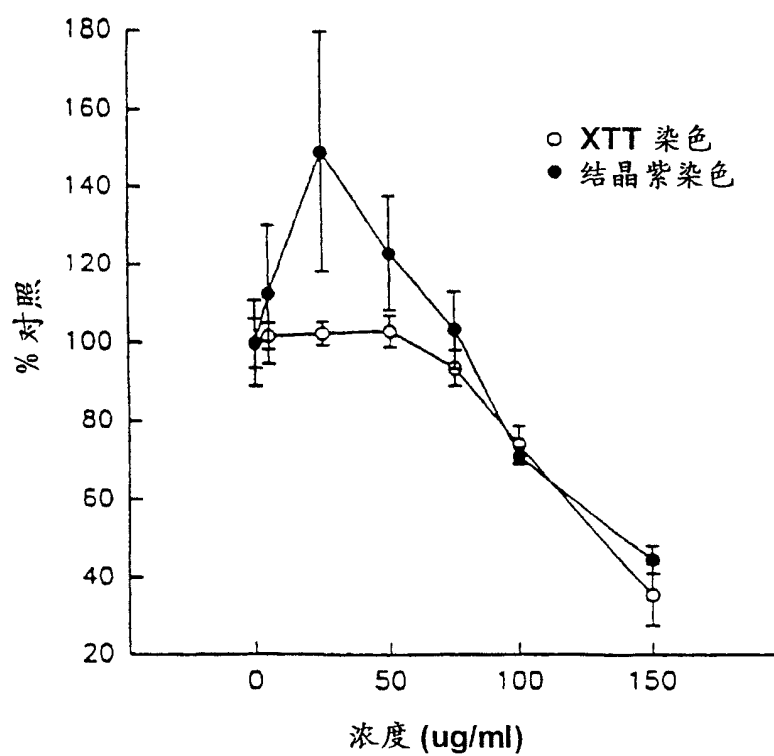
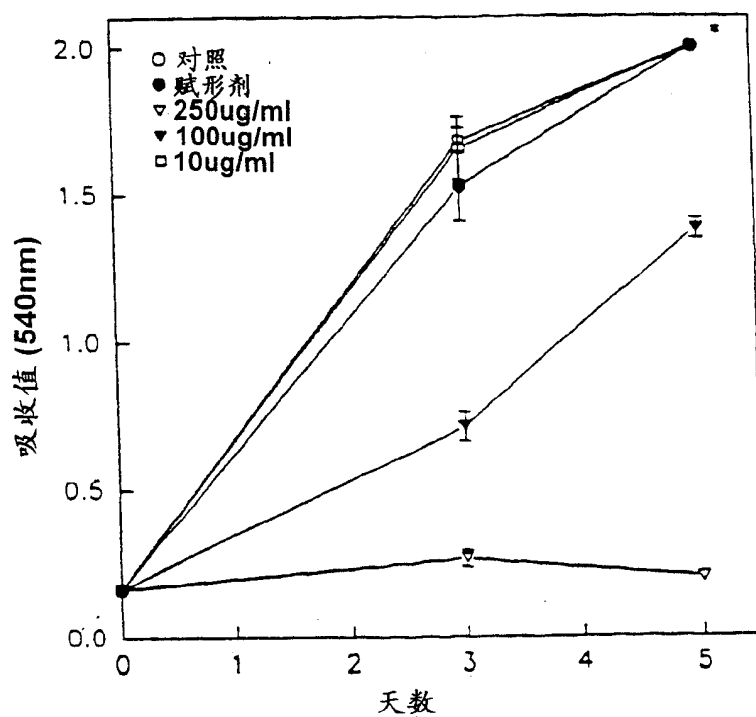


图 15 B: UTT-1粗酚提取物对 MDA MB 231细胞的剂量反应



*注:2.0的吸收值表示平板读数器的最大吸收,
它不代表细胞数.

图 15 C: UTT-1粗多酚提取物对PC-3细胞的剂量-反应关系

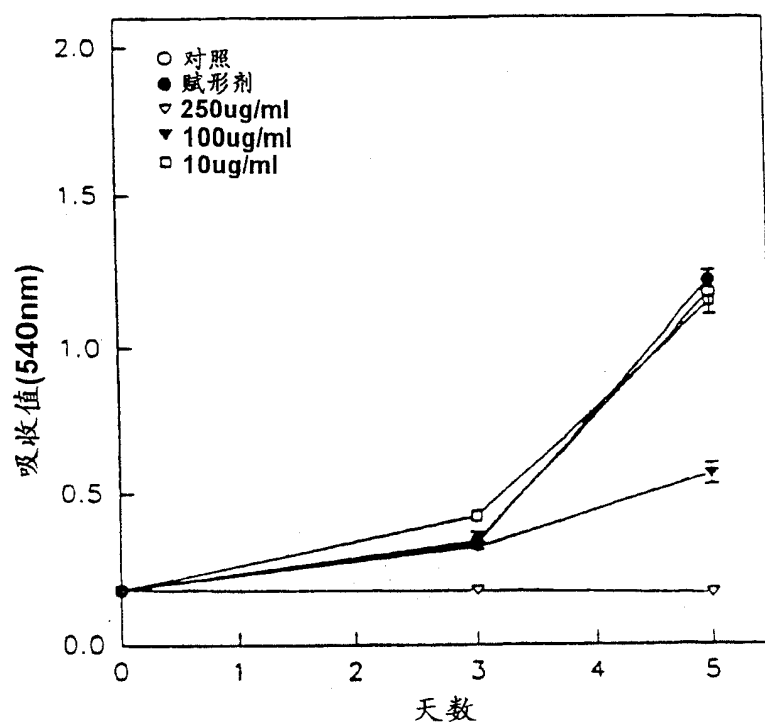
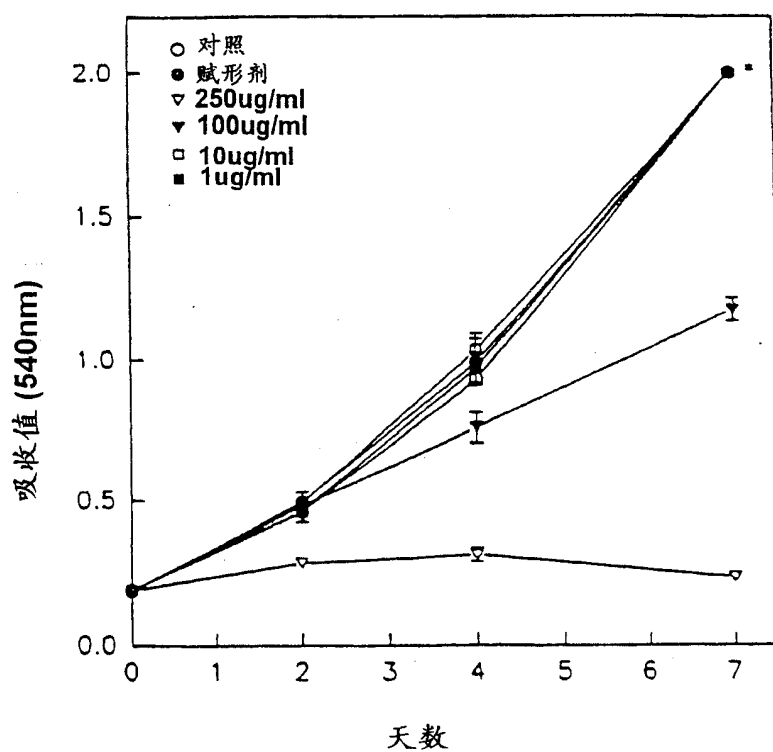
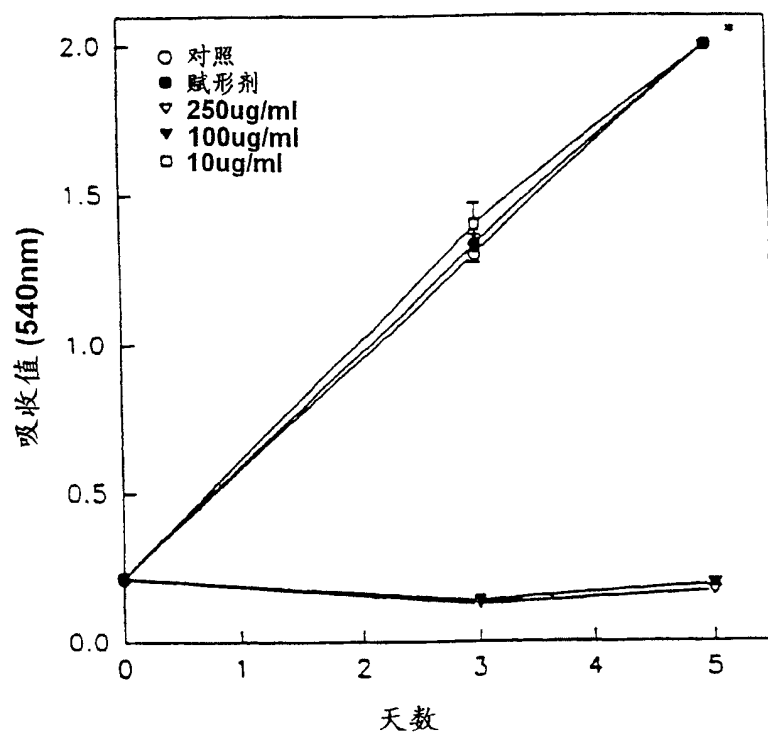


图 15 D: UIT-1粗多酚提取物对MCF-7 p168 细胞的剂量反应



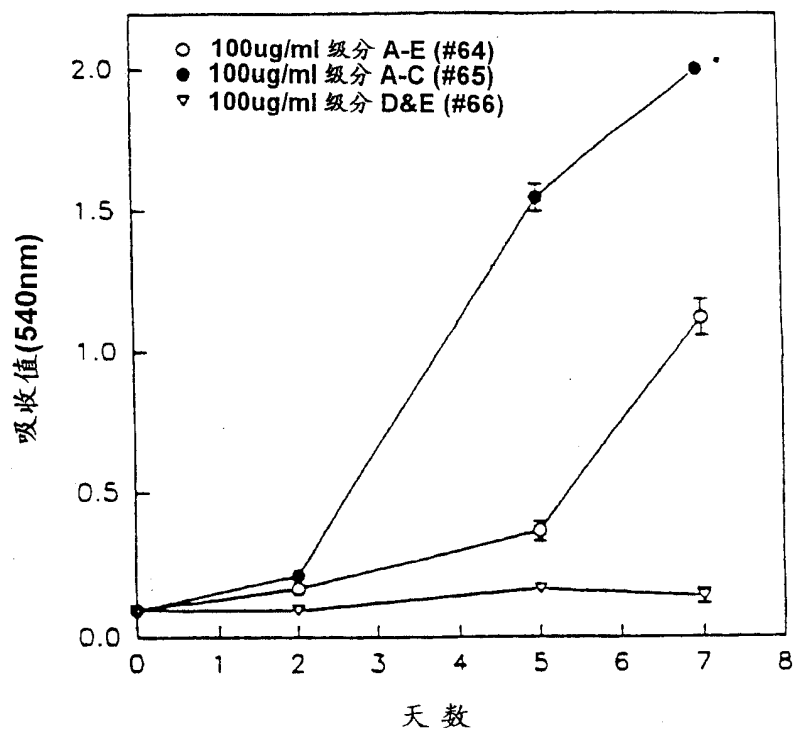
*注:2.0的吸收值表示平板读数器的最大吸收,
它不代表细胞数.

图 15 E: UIT-1粗多酚提取物对Hela细胞的剂量反应



*注:2.0的吸收值表示平板读数的最大吸收,
它不代表细胞数.

图 15 F: 100 μ L/mL的可可级分对Hela细胞的细胞毒性



*注:2.0的吸收值表示平板读数器的最大吸收.
它不代表细胞数.

图 15 G: 100 μ L/mL的可可级分对SKBR-3细胞的细胞毒性

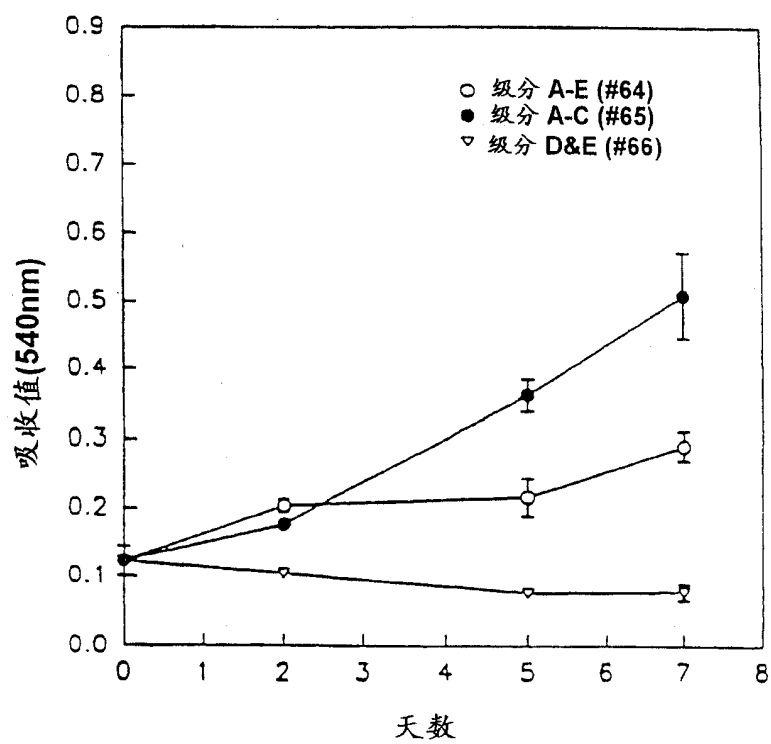
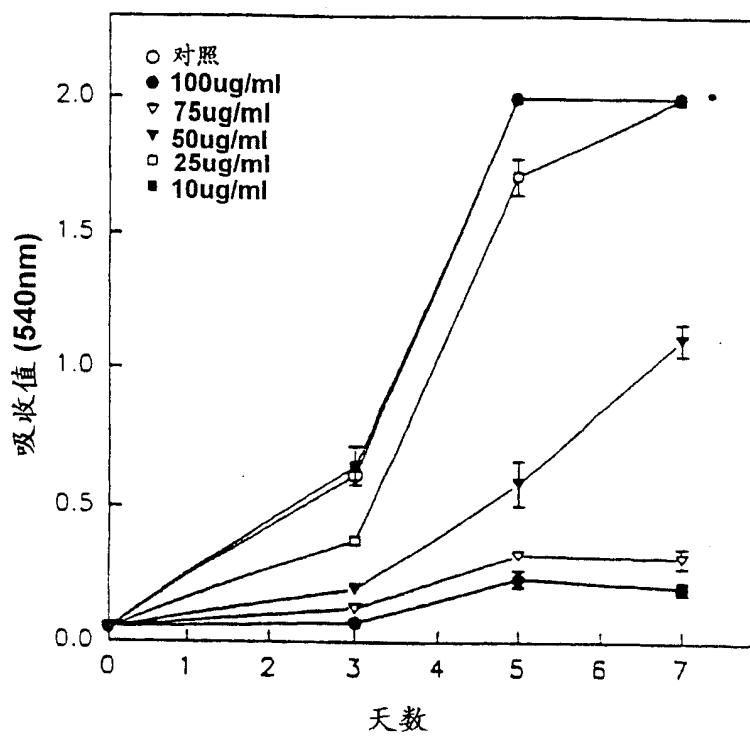


图 15 H: 可可级分D+E对Hela细胞的剂量反应



*注:2.0的吸收值表示平板读数器的最大吸收.
它不代表细胞数.

图 15 I: 可可级分D+E对SKBR-3细胞的剂量反应

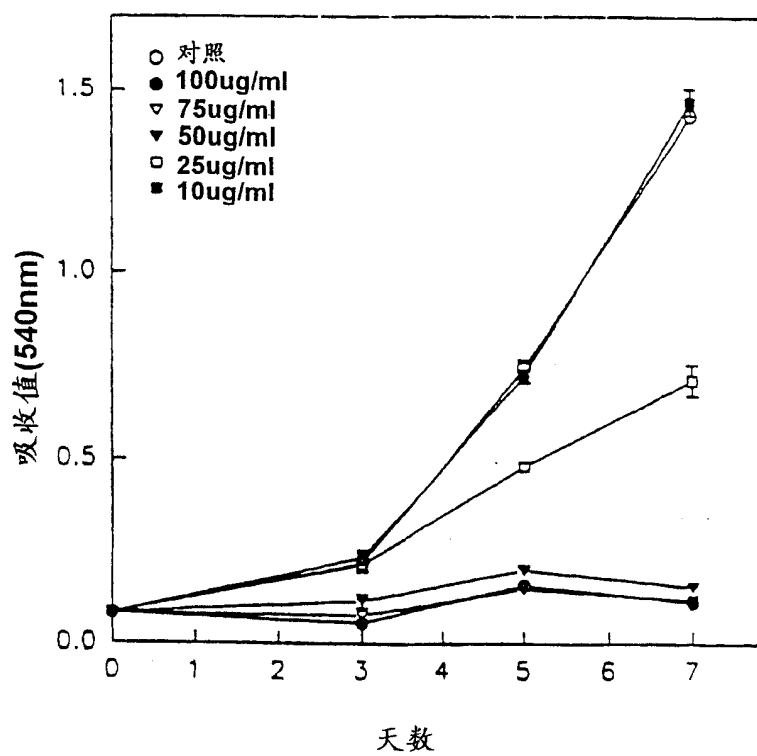


图 15 J: 通过软琼脂集落检测可可级分D+E对Hela细胞的剂量反应

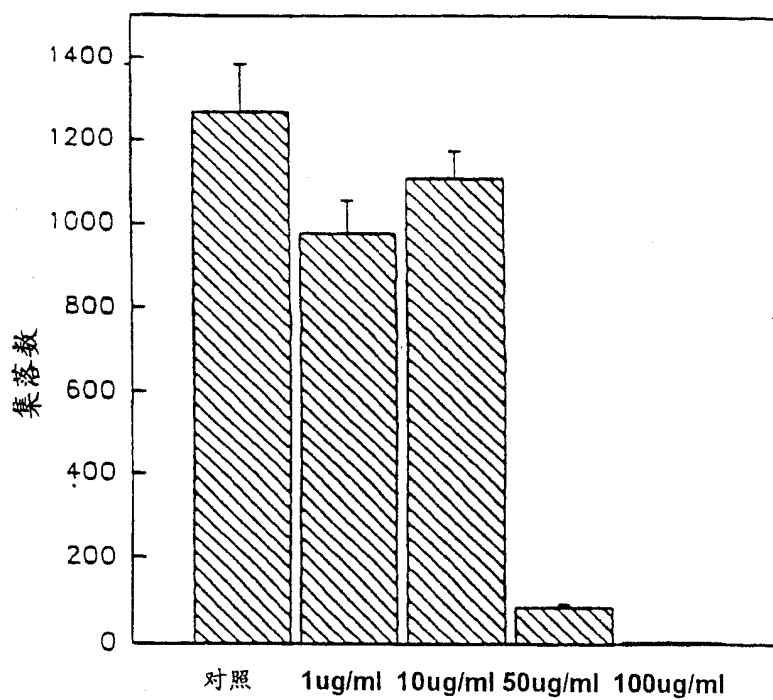
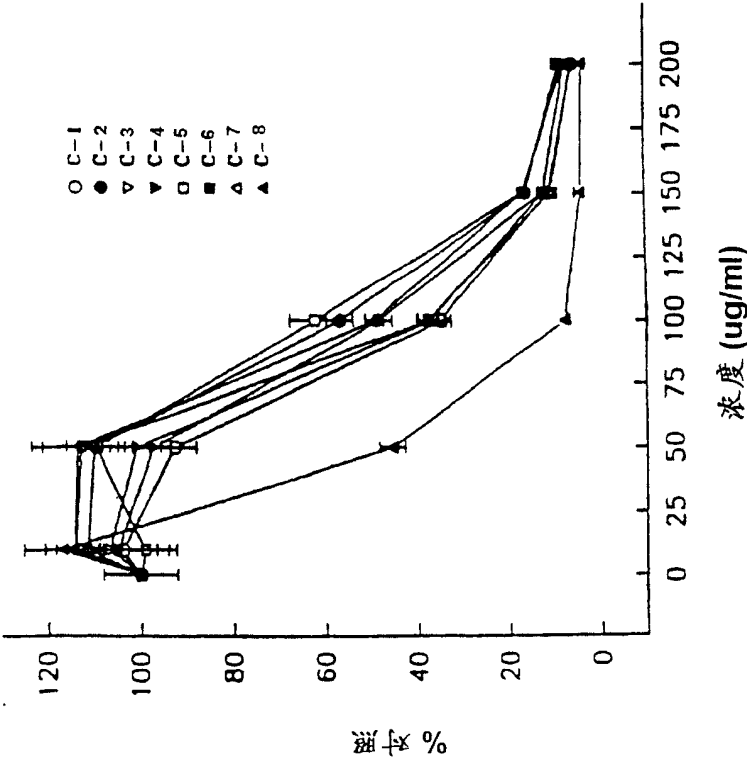


图 15k: 由不同的可可基因型制备的粗可可提取物对Hela细胞的生长抑制作用



#	基因型	园艺品种	描述
C-1	UF-12	CINOLLO	UF-12(巴西)可可多酚的粗提取物(去咖啡因/去可可碱)
C-2	NA-33	FORASTERO	NA-33可可多酚的粗提取物(去咖啡因/去可可碱)
C-3	EEG-48	FORASTERO	EEG-48可可多酚的粗提取物(去咖啡因/去可可碱)
C-4	未知	FORASTERO	未知(西非)可可多酚的粗提取物(去咖啡因/去可可碱)
C-5	UF-613	TRINITARIO	UF-613(巴西)可可多酚的粗提取物(去咖啡因/去可可碱)
C-6	ICS-100	TRINITARIO	ICS-100可可多酚的粗提取物(去咖啡因/去可可碱)
C-7	ICS-130	TRINITARIO	ICS-130可可多酚的粗提取物(去咖啡因/去可可碱)
C-8	UIT-1	TRINITARIO	UIT-1(马来西亚)可可多酚的粗提取物(去咖啡因/去可可碱)

图 15 L: 在发酵和阳光干燥阶段的不同时期得到的可可多酚提取物对Hela细胞生长的抑制

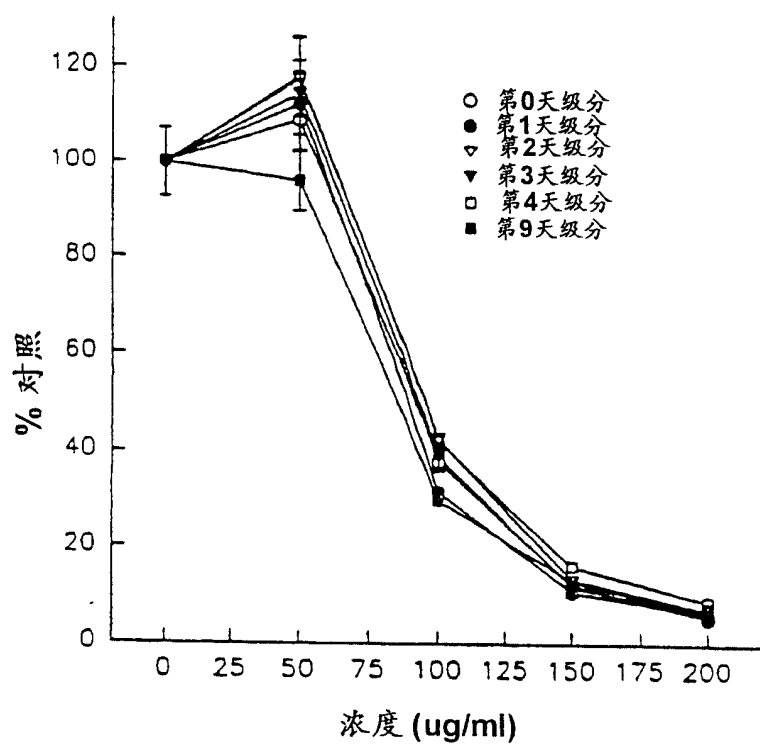


图 15 M:

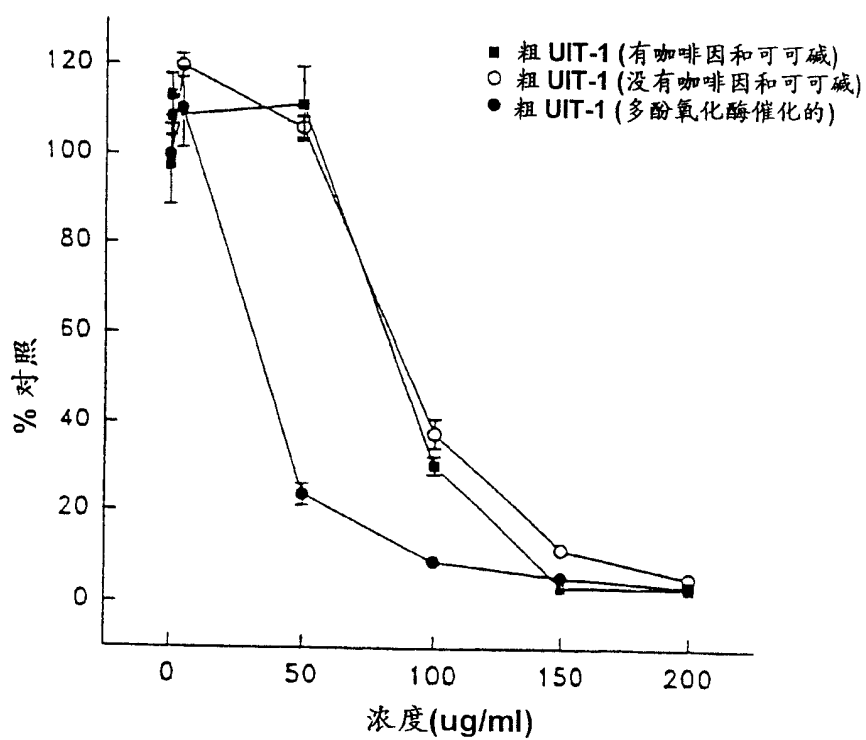


图 15 N: 级分D+E的反相半制备型HPLC分离

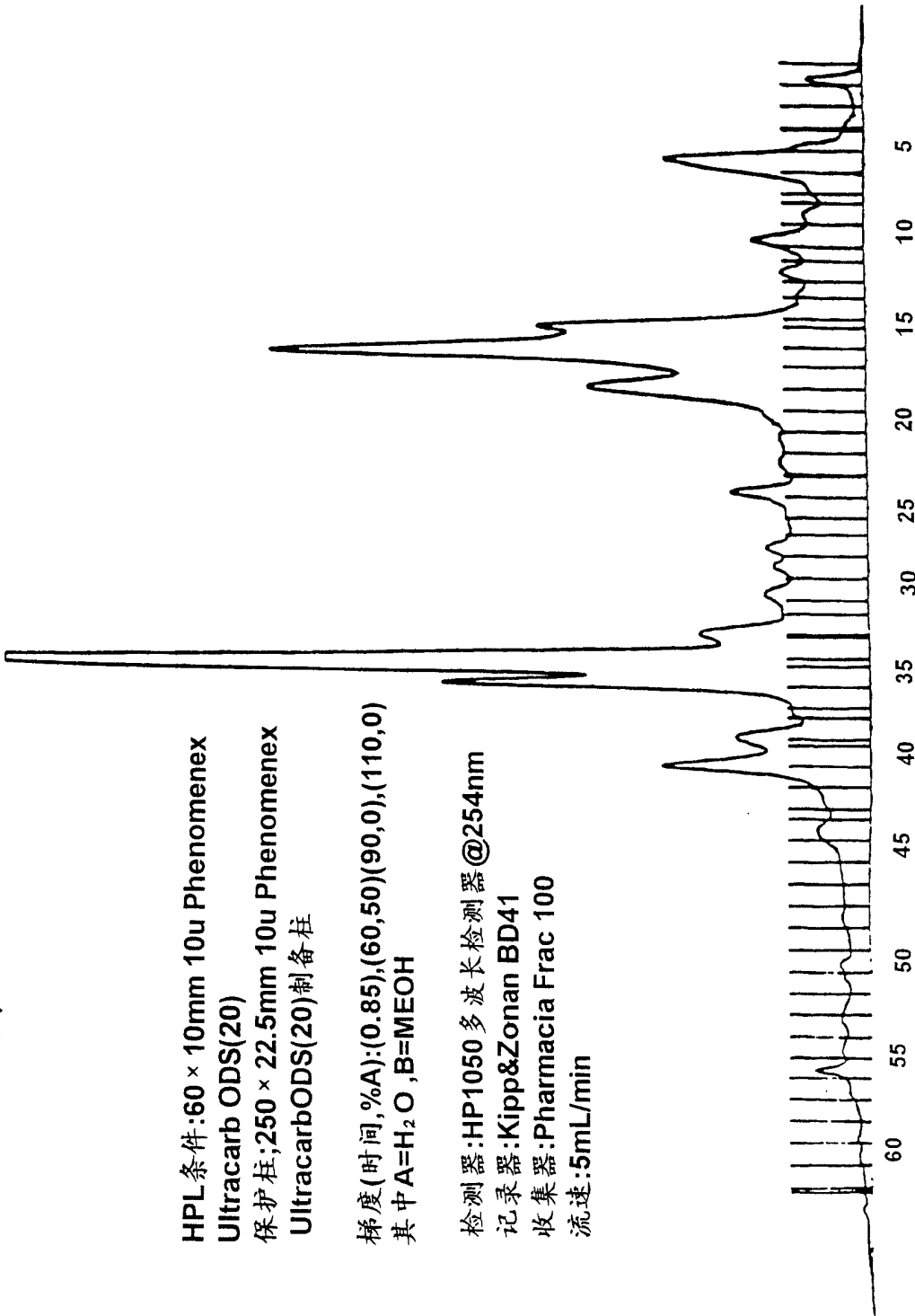
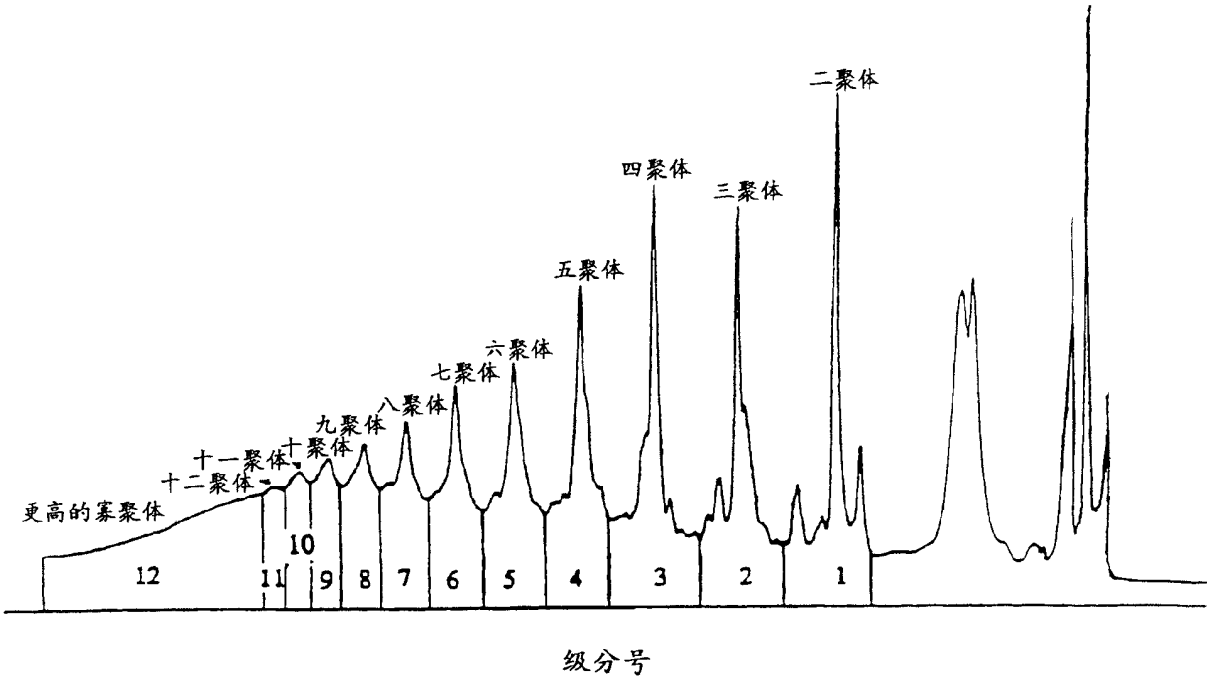


图 15 O: 粗可可多酚提取物的正相半制备型HPLC分离



HPLC条件:250×10mm Supelcocil LC-SI(5μm)半制备柱
20×4.6mm Supelcocil LC-SI(5μm)保护柱
梯度: 时间(分) CH₂Cl₂ 甲醇 乙酸/H₂O(1:1)
0 82 14 4
30 67.6 28.4 4
60 46 50 4
65 10 86 4
70 10 86 4
检测器:Waters LC 分光计 430型@254nm
流速:3mL/min ,环境温度
注射250μL 70% 丙酮水溶液提取物

图 16: 可可原花青素和合成的抗氧化剂的腐败氧化曲线

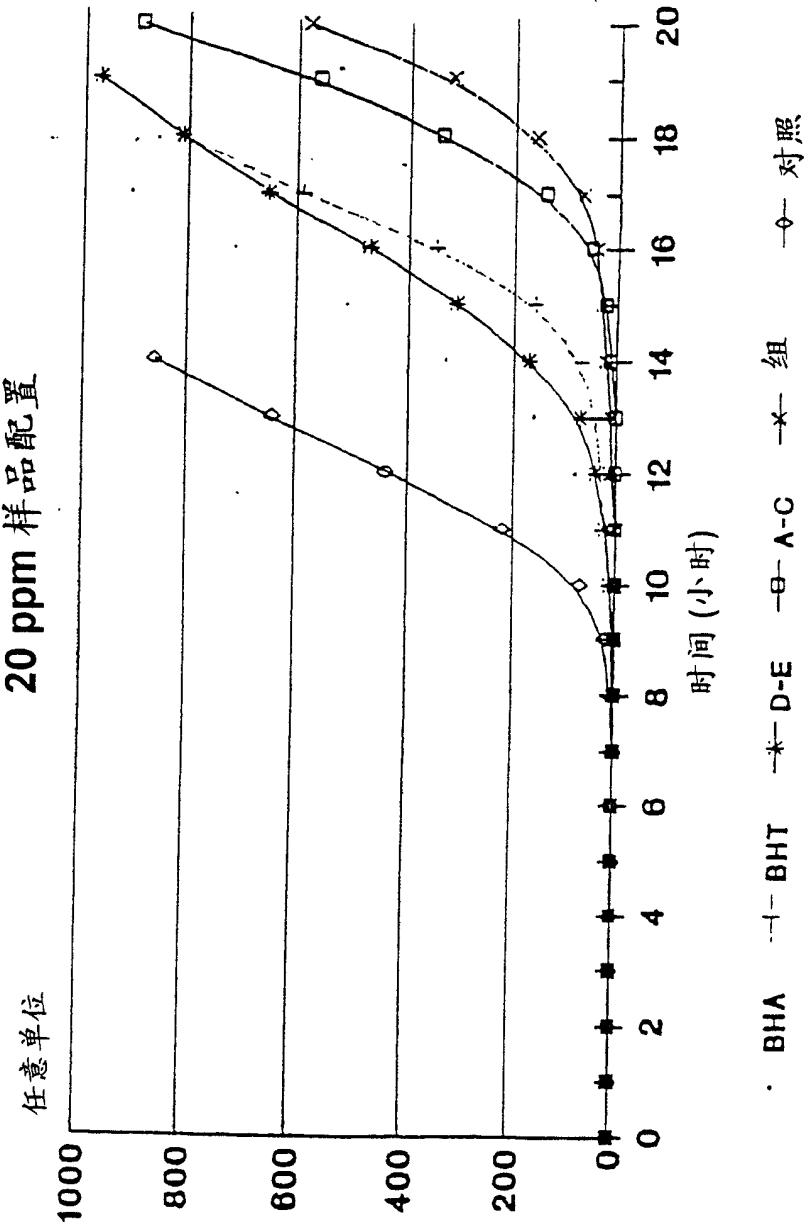
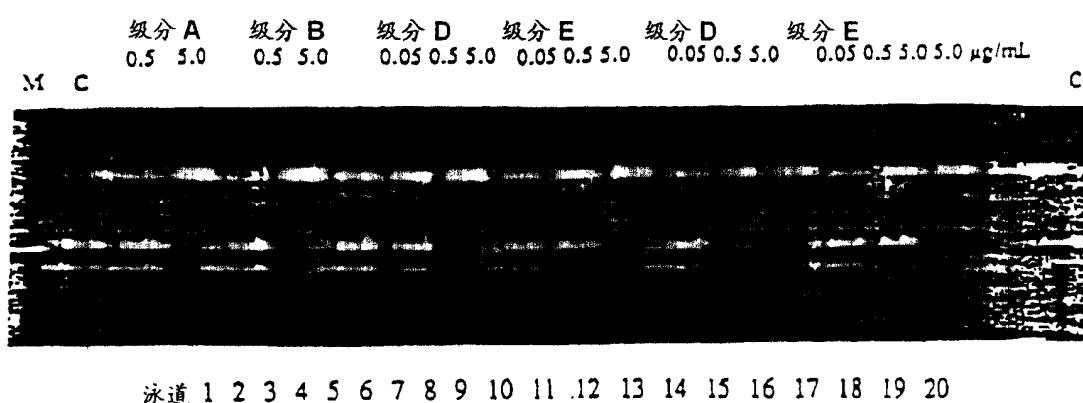


图 17: 可可原花青素级分对拓扑异构酶II催化的动核DNA解链的抑制作用



泳道1含有0.5 μg 标记物(M)-单体长度的动核DNA环。

泳道2和20含有在存在4%DMSO,但不存在可可花青素条件下,与拓扑异构酶II保温的动核DNA(对照C)

泳道3和4含有在存在0.5和5.0 $\mu\text{g/mL}$ 可可原花青素级分A的条件下,与拓扑异构酶II保温的动核DNA。

泳道5和6含有在存在0.5和5.0 $\mu\text{g/mL}$ 可可原花青素级分B的条件下,与拓扑异构酶II保温的动核DNA。

泳道7、8、9、13、14和15是在存在0.05、0.5和5.0 $\mu\text{g/mL}$ 可可原花青素级分D的条件下,与拓扑异构酶II保温的动核DNA的复制物。

泳道10、11、12、16、17和18是在存在0.05、0.5和5.0 $\mu\text{g/mL}$ 可可原花青素级分E的条件下,与拓扑异构酶II保温的动核DNA的复制物。

泳道19是在存在5.0 $\mu\text{g/mL}$ 可可原花青素级分E的条件下,与拓扑异构酶II保温的动核DNA的复制物。

图 18: 可可原花青素分级D和DNA修复感受态和缺陷型细胞系之间的剂量反应关系

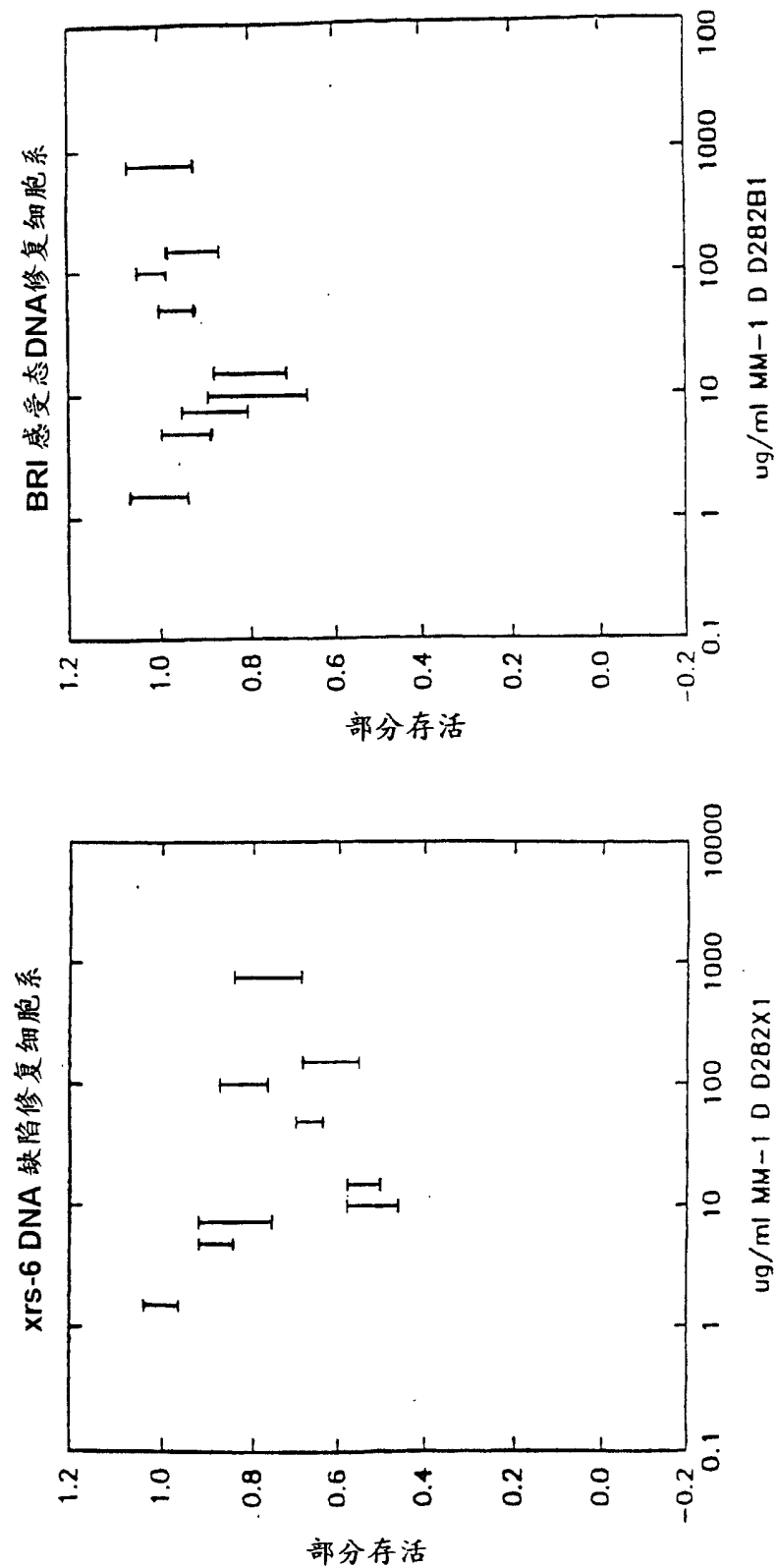


图 19: 用可可级分D+E处理的阿霉素抗性MCF-7细胞与MCF-7 p168亲本细胞系的剂量反应曲线的比较

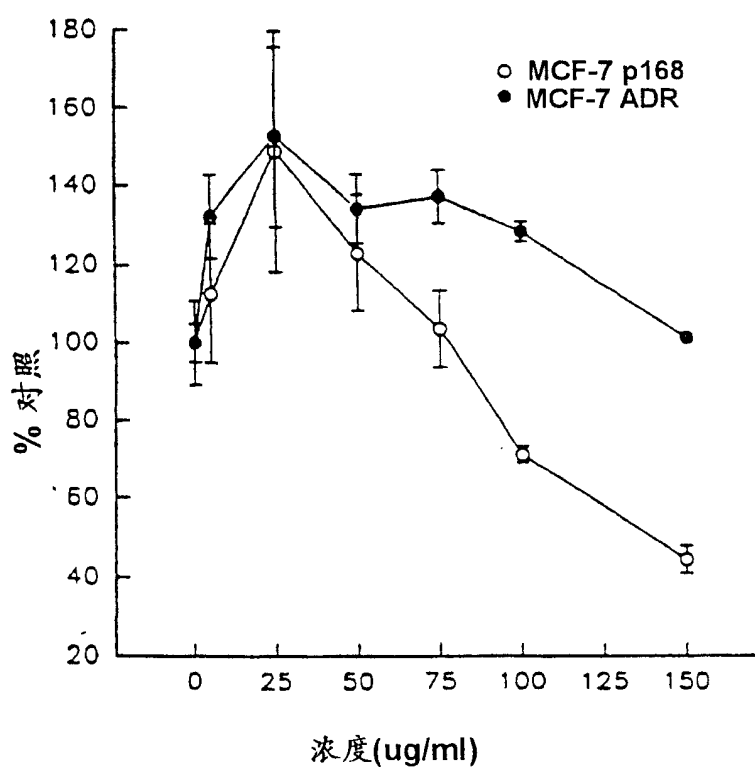


图 20: 正相级分对Hela细胞的剂量反应作用

