

# 大蒜多糖的体外抗凝血作用及结构分析

崔莹莹<sup>1</sup>, 张剑韵<sup>1</sup>, 张容鹄<sup>2</sup>, 黄龙全<sup>2</sup>

1(安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥, 230036) 2(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥, 230036)

**摘 要** 采用碱提法和 DEAE-52 纤维素柱层析法, 从大蒜中分离纯化出 3 种多糖组分(GP I、GP II 和 GP III); 采用体外抗凝血活性试验分析了大蒜粗多糖及其分离组分 GP I 的抗凝血作用; 采用 Sephadex G-100 凝胶层析法和冻融分析法鉴定 GP I 的纯度, 采用气相色谱分析了 GP I 的单糖组成, 首次采用凝胶渗透色谱与多角度光散射仪及示差检测器连用系统测定了 GP I 的分子结构。结果表明: GP I、GP II 和 GP III 分别为大蒜多糖总量的 75.2%、15.5%、9.3%; 大蒜粗多糖及其分离组分 GP I 能显著延长人体血浆的 APTT 值, 通过影响内源性凝血系统发挥抗凝血作用; GP I 由鼠李糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖及 1 种未知单糖组成, 构成比例为 1.5:1.1:3.3:1:5.1:3.5, 分子质量为  $5.2 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^4$  u, 分子旋转半径为 31.5~32.9 nm, 分布宽度指数为 1.039 和 1.084, 分子呈球形。

**关键词** 大蒜多糖, 凝血作用, 构分析

血栓栓塞性疾病严重威胁着人类的健康。目前临床应用较多的抗凝血药物为肝素类多糖, 有诱发血小板减少症等副作用<sup>[1]</sup>。开发具有抗凝血作用的非肝素类药物及功能性食品有着重要的意义。大蒜是药食兼用的佳品, 富含蒜氨酸和多种生理活性成分, 大蒜多糖(garlic polysaccharides, GP)是功能成分之一, 具有抗氧化、抗病毒、增强免疫力、保护肝脏等多种功效<sup>[2]</sup>。多糖的功能与其结构密切相关。关于大蒜多糖的组成和分子质量的研究结果存在差异<sup>[3-6]</sup>, 对结构的研究有待深入。凝胶渗透色谱与多角度光散射仪及示差检测器连用系统(GPC-MALLS-RI)兼具凝胶渗透色谱法和光散射法的特点, 不需要标准品, 可快速、准确地测定多糖的绝对分子质量、分子旋转半径和分布宽度指数, 并可判断多糖的构象。本试验采用 DEAE-52 纤维素柱分离纯化大蒜粗多糖, 检测粗多糖及其分离组分 GP I 的体外抗凝血作用; 并采用 GPC-MALLS-RI 测定大蒜多糖组分 GP I 的分子量、分子旋转半径、分布宽度指数和构象; 进一步分析了 GP I 的结构与抗凝血作用的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

新鲜大蒜购于安徽农业大学菜场。

健康人体血浆由合肥市中心血站提供。活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time,

APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和凝血酶时间(thrombin time, TT)检测试剂盒均为上海太阳生物技术有限公司产品。无水乙醇、浓硫酸等试剂均为国产分析纯。

Sephadex G-100 凝胶柱(瑞典 Pharmacia 公司); DEAE-52 纤维素柱为(英国 Whatman 公司); TU-1800 SPC 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司); Coatron M1 单通道凝血仪(德国 TECO 公司); HP-6890 气相色谱仪(美国 Agilent 公司); GPC-MALLS-RI 凝胶渗透色谱与多角度光散射仪及示差检测器连用系统(美国 Wyatt Technology 公司)。

### 1.2 大蒜粗多糖的提取、分离和纯化

取大蒜 100 g, 加入 0.5 mol/L NaOH 溶液 500 mL, 55℃ 水浴浸提, 过滤, 合并滤液, 用 1 mol/L HCl 溶液中和, 浓缩至原体积的 1/4, 离心, 取上清液, 用 Sevag 法除蛋白<sup>[7]</sup> 5 次, 加 4 倍无水乙醇醇沉, 得大蒜粗多糖。取复溶后的大蒜粗多糖, 参照倪德江的方法<sup>[8]</sup>, 进行 DEAE-52 纤维素(1.6 cm × 60 cm)柱层析, 用苯酚-硫酸法检测多糖<sup>[9]</sup>, 并绘制洗脱曲线。合并收集峰顶部洗脱液, 用于后继分析。采用 Sephadex G-100 凝胶层析法和冻融分析法鉴定大蒜多糖组分 GP I 的纯度<sup>[10]</sup>。

### 1.3 大蒜粗多糖及其分离组分 GP I 的抗凝血活性分析

用凝血仪对大蒜粗多糖及其分离组分 GP I 进行体外抗凝血活性测定。APTT、PT 和 TT 的测定方法参照试剂盒和仪器说明书进行, 另以等量生理盐水代替待测样品为对照。

第一作者: 硕士研究生(黄龙全教授为通讯作者)。

收稿日期: 2009-02-20, 改回日期: 2009-03-11

1.4 大蒜多糖组分 GP I 的气相色谱分析

采用三甲基硅化法<sup>[11]</sup>制备大蒜多糖组分 GP I 水解物和混合单糖标品的衍生物。气相色谱条件: 色谱柱为 HP-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 石英毛细管柱, 升温程序: 从 160℃ 保持 10 min 以 5℃/min 升至 220℃, 再以 20℃/min 升至 280℃ 并保持 10 min; 进样温度: 250℃, FID 检测器 280℃, 进样体积 1 μL。用混合单糖标品的出峰时间确定样品中单糖的种类, 根据峰面积计算单糖的构成比例。

1.5 大蒜多糖组分 GP I 的结构分析

取 7.5 mg 大蒜多糖组分 GP I 溶于 5 mL 0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub>, 25℃ 静置 1 h, 用 0.45 μm 过滤器过滤后, 于 GPC-MALLS-RI 连用系统上测定 GP I 的分子量、分子旋转半径、分布宽度指数和构象。分析仪器由 Waters 515 型泵及柱温箱 (美国 Waters 公司), OHpak SB-805 HQ 型凝胶色谱柱 (日本 Showa Denko 公司), DAWN HELLOS 型十八角静态激光光散射仪和 Optilab Rex 型示差检测器 (美国 Wyatt Technology 公司) 构成, 流动相为 0.2 mol/L NaCl, 流速 0.6 mL/min, 样品的折光指数增值为 0.145 mL/g, 用 Astra 软件对数据进行采集和处理。

2 结果与分析

2.1 大蒜粗多糖的抗凝血作用和分离、纯化

表 1 为大蒜粗多糖的凝血指标测定结果。APTT、PT 和 TT 是医学上常用来确定凝血途径的 3 项指标。APTT 反映内源性凝血系统各凝血成分总的凝血状况; PT 反映外源性凝血系统的凝血状况; TT 反映血浆纤维蛋白原转变为纤维蛋白的凝血状况<sup>[12]</sup>。试验结果显示, 大蒜粗多糖能显著改变人体血浆的 APTT 值, 而对 TT、PT 值均无明显影响, 表明大蒜粗多糖主要是通过内源性凝血系统起作用的。

表 1 大蒜粗多糖对凝血指标的影响

样 品	活化部分凝活 酶时间	凝血酶原 时间	凝血酶 时间
大蒜粗多糖	73.00 ± 4.06	15.65 ± 0.28	15.50 ± 0.20
对 照	31.20 ± 0.20	14.35 ± 0.33	13.60 ± 0.00

注: 表中数据为平均值 ± 标准差, (n = 3)。

由图 1 可见, 大蒜粗多糖经 DEAE-52 纤维素柱层析分离出 3 个组分, 分别简称为 GP I、GP II 和 GP III, 占大蒜多糖组分总量的百分比分别为 75.2%、15.5%、9.3%, 其中 GP I 的含量最高, 本研究首先对 GP I 做进一步的分析。

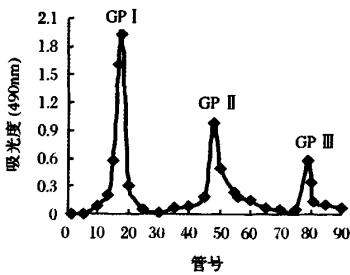


图 1 大蒜粗多糖的 DEAE-52 纤维素柱层析图

表 2 为不同浓度的 GP I 的 APTT 凝血指标的检测结果。结果表明: 在实验范围内, 检测体系中 GP I 的浓度越高其抗凝血作用也越强。

表 2 GP I 的浓度与抗凝血活性之间的关系

浓度/mg. mol <sup>-1</sup>	活化部分凝血酶时间/s
0.1	56.43 ± 3.17 **
1	93.06 ± 1.57 **
2	115.20 ± 5.87 **
4	228.40 ± 10.00 **
对照	34.50 ± 0.70

注: 表 2 中数据为平均值 ± 标准差 (n = 3); 与对照值比较, \*\* 表示 P < 0.01。

将 GPI 复溶后, 进行 Sephadex G-100 柱层析, 得到图 2 所示的洗脱曲线, 洗脱峰呈单一对称; 且 GPI 经冻融高速离心后无沉淀产生, 表明 GPI 为均一组分。

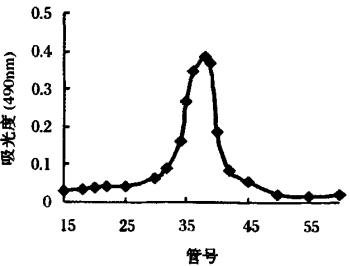


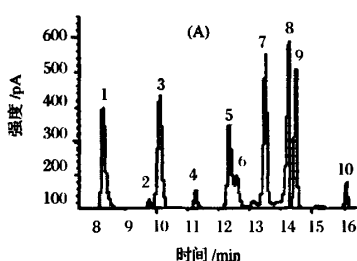
图 2 GP I 的 sephadex G-100 层析图

2.2 GP I 的单糖组成分析

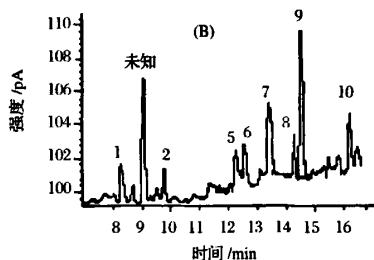
在选定的试验条件下, 标准单糖经气相色谱分析的出峰时间分别为: 鼠李糖 (8.298, 9.754 min)、木糖 (10.084, 11.232 min)、果糖 (12.327, 12.571 min)、半乳糖 (13.505 min)、葡萄糖 (14.233, 16.054 min)、甘露糖 (14.472 min) (图 3A)。图 3B 为 GP I 经酸水解、衍生化后的气相色谱图, 从 GP I 中检测出了鼠李糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖及一种未知单糖, 构成比例为 1.5 : 1.1 : 3.3 : 1 : 5.1 : 3.5, 半乳糖和甘露糖的构成比例较大。

2.3 GP I 的分子量、分子旋转半径和构象

在最佳洗脱体积为 6.202 ~ 12.394 mL, 折光指



(A) 标准单糖的气相色谱图



(B) GPI的气相色谱图

1,2-鼠李糖;3,4-木糖;5,6-果糖;7-半乳糖  
8,10-葡萄糖;9-甘露糖

图3 标准单糖及GP I的气相色谱图

数增值为0.145 mL/g,最适角度为1的测试条件下, GPC-MALLS-RI系统结合Astra软件通过Zimm外推法<sup>[13]</sup>算出GP I的分子质量、分子旋光半径、分散宽度指数(表3)。多糖分子质量的表达方式主要有3种:按分子重量统计平均分子量的重均分子量;按物质量统计平均分子量的数均分子量;按Z量统计平均分子量的Z均分子量<sup>[14]</sup>。分布宽度指数表征多糖的多分散程度<sup>[15]</sup>。由表3可知,GP I的分子量为 $5.2 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^4$  u,分子旋转半径为31.5~32.9 nm。分布宽度指数接近于1,表明GP I的多分散程度较低,分子量分布较集中。另一方面,测定误差均小于5%,说明本试验精密密度较好。

表3 GP I的结构特征

结构特征	结果	误差/%
分子质量/u		
数均分子质量	$5.2 \times 10^4$	1
重均分子质量	$5.4 \times 10^4$	1
z均分子质量	$5.6 \times 10^4$	3
分子旋光半径/nm		
数均分子旋转半径	31.5	2
重均分子旋转半径	32.2	2
z均分子旋转半径	32.9	2
分布宽度指数		
重均分子质量/数均分子质量	1.039	2
z均分子质量/数均分子质量	1.084	3

分别取GP I的重均分子量和分子旋光半径的对

数值作图得一直线,由直线斜率可判断GP I分子的构象<sup>[13]</sup>。计算得到的斜率为0.12小于0.33,结果表示GP I为球形分子。

### 3 讨论

汪新亮等人<sup>[16]</sup>报道大蒜粗多糖可明显延长小鼠血浆的APTT值,这与本研究结果一致,但未对粗多糖进行分离纯化和结构分析。

测定大蒜多糖的单糖组成,多采用糖醇乙酸酯衍生化法,将果糖还原成甘露糖醇和山梨糖醇后再衍生化,在存在甘露糖的情况下,影响对果糖的定性和定量。本试验采用三甲基硅醚衍生化法,通过气相色谱直接检测果糖,还未见相同报道。

气相色谱测得GP I中鼠李糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖及1种未知单糖的构成比例1.5:1.1:3.3:1:5.1:3.5。GPC-MALLS-RI系统测得GP I的分子质量为 $5.2 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^4$  u。Jack等人从大蒜中用乙醇水溶液提取出低聚果糖和多聚果糖,主要由果糖和葡萄糖以15:1的比例组成,分子质量为 $1.0 \times 10^3 \sim 4.5 \times 10^3$  u<sup>[3]</sup>;Baumgartner等人分离出的大蒜多糖为含有少量葡萄糖的果聚糖,其分子质量为 $1.0 \times 10^4$  u<sup>[4]</sup>。杨铭等人从大蒜中分离出富硒大蒜多糖,通过高效液相色谱及纸层析测定其为甘露聚糖,分子质量为 $1.5 \times 10^4$  u<sup>[5]</sup>;黄雪松用水提法从大蒜粉中提取多糖,用薄层层析法和气相色谱法检测出其由果糖、葡萄糖、半乳糖以85:14:1的比例组成,高效液相色谱法测得其分子质量为 $7.1 \times 10^3$  u<sup>[6]</sup>。试验结果不一致的原因可能与原料、分离纯化及测定的方法,分离纯化过程中多糖可能发生降解有关,有待于进一步的研究。

本试验首次采用GPC-MALLS-RI系统分析了大蒜多糖组分GP I的构象,结果表示GP I为球形分子,推测GP I的分子链柔性较大,在链内氢键的作用下,折叠卷曲形成较为稳定的球形结构。

GP I中半乳糖的构成比例较大,与具有抗凝血活性的刺参酸性黏多糖、半乳聚糖硫酸酯等的单糖构成<sup>[17,18]</sup>相比,这一特征可能为GP I具有抗凝血活性的主要原因。因半乳糖是粘附分子凝集素家族识别的配体,其与凝集素结合后,阻断了凝集素在血栓形成中的粘附作用,从而达到抗凝血的效果<sup>[19]</sup>。一般认为,不同高分子溶液的粘度为纤维状分子>无规线团分子>球形分子<sup>[20]</sup>。GPI为球形分子,黏度较小,有利于扩散。GPI的构象也有利于抗凝血作用的发挥。

#### 4 结论

(1)采用碱提法和 DEAE-52 纤维素柱层析法,从大蒜中分离纯化出 3 种多糖组分(GP I、GP II 和 GP III)。体外抗凝血试验表明,大蒜粗多糖及其分离组分 GP I 能显著延长人体血浆的 APTT 值,通过影响内源性凝血系统发挥抗凝血作用。

(2)气相色谱结果显示,GP I 中鼠李糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖及一种未知单糖的构成比例为 1.5:1.1:3.3:1:5.1:3.5。GPC-MALLS-RI 系统测得 GP I 的分子质量为  $5.2 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^4$  u,分子旋转半径为 31.5 ~ 32.9 nm,分布宽度指数为 1.039 和 1.084,分子呈球形。本研究结果表明,大蒜多糖的抗凝血作用有开发应用价值。GP II 和 GP III 有待于以后分析。

#### 参 考 文 献

- 1 乔彦,吕晓川. 抗凝血药物研究进展[J]. 中国心血管病研究杂志, 2005, 3(8): 631 ~ 634
- 2 王文玲,黄雪松,曾莉莎. 大蒜多糖的研究综述[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(4): 144 ~ 146
- 3 Jack NL, Shuryo N. Molecular size of garlic fructooligosaccharides and fructopolysaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(11): 4 342 ~ 4 346
- 4 Baumgartner S, Thomas G, Dax W, et al. Characterisation of the high-molecular weightfructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.) [J]. Carbohydr Res, 2000, 32(8): 177 ~ 181
- 5 杨铭,邹彤彤. 天然补硒剂的探索—大蒜含硒多糖的结构及生物活性研究[J]. 中国药学, 1992, (1): 28 ~ 32
- 6 黄雪松. 大蒜多糖的提取分离与分析[J] 食品科学, 2005, 26(9): 48 ~ 51
- 7 朱永智,陈旭. 不同品种、产地淫羊藿多糖的含量测定[J]. 天津中医药, 2004, 21(1): 68 ~ 69
- 8 倪德江. 乌龙茶多糖的形成特征、结构、降血糖作用及其机理[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003. 57
- 9 董群,郑丽伊,方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 31(9): 550 ~ 553
- 10 欧瑜,刘志礼. 盐生隐杆藻多糖的提纯及含量分析[J]. 海洋湖沼通报, 1996, 9(3): 33 ~ 38
- 11 陶乐平,丁在富,张都昌. 气相色谱在多糖结构测定中的应用[J]. 色谱, 1994, 12(5): 351 ~ 354.
- 12 Zimm BHJ. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions [J]. J Chem Phys, 1948, 16: 1 093 ~ 1 099
- 13 封聚强,赵骏. 中药多糖的分子量及结构研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 624 ~ 625
- 14 Millard MM, Dintzis FR, Willett JL, et al. Light - scattering molecular weights and intrinsic viscosities of precessed waxy maize starches in 90% dimethyl sulfoxide and H<sub>2</sub>O [J]. Cereal Chem, 1997, 74(5): 687 ~ 691
- 15 王学峰,王鸿利. 血栓与止血的检测及应用[M]. 上海: 世界图书出版公司, 2002. 164 ~ 184
- 16 汪新亮,吴基良,郑敏,等. 大蒜多糖对凝血系统及血小板聚集的影响[J]. 实验研究, 2008, 40(9): 80 ~ 81
- 17 姚成芳,蔡生业,王丽,等. 复方花刺参制剂抗凝血机制的实验研究[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(1): 33 ~ 35
- 18 Matsubara K, Matsuura Y, Bacic A, et al. Anti-cogulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga *Codium cylindricum* [J]. Int J Biol M acromol, 2001, 28: 395 ~ 399
- 19 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1995. 42 ~ 62
- 20 张丽萍,张翼伸,孙非,等. 硫酸化对金顶侧耳多糖构象及生物活性的影响[J]. 生物化学与生物物理学报, 1994, 26(4): 417 ~ 421

### Study on Structure Analysis and Anticoagulant Function *in vitro* of Garlic Polysaccharides

Cui Yingying<sup>1</sup>, Zhang Jianyun<sup>1</sup>, Zhang Ronghu<sup>2</sup>, Huang Longquan<sup>2</sup>

1 (Life Science College of Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

2(Tea and Food Science College of Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**ABSTRACT** Three kinds of polysaccharides (GP I, GP II, GP III) were separated from garlic with alkali extraction, purified by DEAE-52 cellulose column, the anticoagulant function *in vitro* of garlic polysaccharides was analyzed, the purity of GP I was verified by Sephadex G-100 and frozen-thawing-analysis, the monosaccharide constituents of GP I was determined by gas chromatogram, GPC-MALLS-RI was applied to determine molecular structure of GP I for the first time. Results: GP I, GP II and GP III occupied of total garlic polysaccharides were 75.2%, 15.5%, 9.3%, respectively. Garlic polysaccharides had the anticoagulant function, which could effectively prolong APTT of human plasma, GP I worked by affecting intrinsic pathway coagulation system, GP I contained rhamnose, fructose, galactose, glucose and mannose and unknown monosaccharide, with the constituent ratio of 1.5:1.1:3.3:1:5.1:3.5, the molecular weight of GP I ranged from  $5.2 \times 10^4$  u to  $5.6 \times 10^4$  u, the root mean square (rms) radius ranged from 31.5 nm to 32.9 nm, two polydispersity values were 1.039 and 1.084, respectively, It was spherical polymer. The results showed that the garlic polysaccharides had potential development value.

**Key words** garlic polysaccharides, anticoagulant, structure analysis