

# 吡咯基丙氨酸的合成表征及对腊八蒜的增色作用

王丹<sup>1,2</sup>, 胡小松<sup>3</sup>, 赵广华<sup>3,\*</sup>

(1.北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097; 2.食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学, 天津 300457; 3.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要:**为延长腊八蒜的货架期, 使其长时间维持绿色, 实验采用 Paal-Knorr 方法体外合成色素形成关键物质吡咯基丙氨酸, 研究其对腊八蒜色素形成的影响, 并通过质谱、红外图谱、核磁共振光谱表征其结构。结果表明: 加入 5.0mmol/L 的吡咯基丙氨酸能够延长腊八蒜绿色素的生成, 维持其商品性状至少 45d, 且此时色素的形成仍呈上升趋势, 吡咯基丙氨酸对腊八蒜具有增色作用。

**关键词:**腊八蒜; 绿色素; 吡咯基丙氨酸; 结构鉴定

## Synthesis and Characterization of Pyrrolyl Alanine and Its Hyperchromic Effect on Laba Garlic Pigments

WANG Dan<sup>1,2</sup>, HU Xiao-song<sup>3</sup>, ZHAO Guang-hua<sup>3,\*</sup>

(1. Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Pyrrolyl alanine, which can increase the shelf life of Laba garlic and maintain its green color, was synthesized by Paal-Knorr method and characterized by mass spectroscopy, infrared spectroscopy and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The hyperchromic effect of pyrrolyl alanine on Laba garlic pigments was also explored. The results showed that the addition of pyrrolyl alanine at the dose of 5.0 mmol/L prolonged the formation of green pigments in Laba garlic and as a result, the commodity character of Laba garlic could be maintained for 45 days at least. Moreover, the formation of green pigments still exhibited an upward trend after 45-day storage. Therefore, pyrrolyl alanine has an obvious hyperchromic effect on Laba garlic pigments.

**Key words:** Laba garlic; green pigment; pyrrolyl alanine; identification

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0001-04

目前大蒜加工过程中常出现绿变的情况, 影响商品性状, 导致其经济价值下降; 但此绿色素却为中国传统蒜制品腊八蒜的呈色物质。它是一种天然的植物次生代谢产物, 是不同于叶绿素的天然色素<sup>[1]</sup>。但是, 绿色素不稳定<sup>[2-3]</sup>, 所以无法长时间维持其商品性状, 致使腊八蒜存在很严重的货架期问题。大蒜绿变的研究已有 50 多年, 至今其机理仍未阐明。近来研究表明丙烯基硫代亚磺酸酯与丙氨酸反应生成 *N*-(3,4-二甲基)吡咯基丙氨酸类化合物, 此物质再与烯丙基硫代亚磺酸酯生成紫红色素, 由此推测 *N*-(3,4-二甲基)吡咯基丙氨酸可能是

洋葱红变过程中产生的中间体, 但仅仅体外实验不足以证明此结论, 他们认为吡咯环进一步聚合能够形成绿色素<sup>[4]</sup>, 而且洋葱红变与大蒜绿变的机理相似<sup>[5-9]</sup>, 那么 *N*-(3,4-二甲基)吡咯基丙氨酸是否为腊八蒜或大蒜绿变过程中的重要物质? 如果其为色素形成的关键物质, 那么此物质有延长腊八蒜绿色素生成的可能性。如果具有增色作用, 可以在腊八蒜生产过程中加入此物质, 研究其对腊八蒜的增色作用, 为解决腊八蒜的工业化生产中货架期问题提供理论依据。由于腊八蒜的体系很复杂, 本实验从模拟体系为切入点, 采用 Paal-Knorr 方

收稿日期: 2010-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(3100786); 第四十七批中国博士后科学基金项目(20100470789)

作者简介: 王丹(1980—), 女, 博士, 主要从事食品化学研究。E-mail: wanger1980@yahoo.com.cn

\* 通信作者: 赵广华(1969—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品化学研究。E-mail: guanghzhao@yahoo.com.cn

法<sup>[10-12]</sup>合成 *N*-(3,4-二甲基)吡咯基丙氨酸的类似物吡咯基丙氨酸, 此物质比 *N*-(3,4-二甲基)吡咯基氨基酸少两个甲基, 因为甲基为非功能基团, 不影响其色素形成的反应, 并通过红外、核磁共振、质谱等手段鉴定其结构, 将其加入腊八蒜中, 研究其浓度与色素含量的关系, 为有效延长腊八蒜维持绿颜色提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

当年秋季收获的大蒜, 购于中国农业大学附近农贸市场。放置于 4℃ 冷库中贮藏约 2 个月后取出作为实验材料。

丙氨酸(分析纯) 北京欣经科试剂公司; 2,5-二甲氧基四氢呋喃(色谱纯) 美国 Fluka 公司; 冰醋酸、盐酸、无水乙酸钠、无水硫酸钠、氢氧化钾、乙酸乙酯、活性炭(分析纯) 北京化学试剂公司; 无水甲醇(色谱纯) 美国 Sigma 公司。

85-2 型恒温磁力搅拌器 上海司乐仪器有限公司; dpx-300MHz 核磁共振仪(氘代二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂, 四甲基硅烷(TMS)用作内标参数) 德国 Bruker 公司; 100 FT-IR 红外光谱仪 美国珀金埃尔默仪器有限公司; Waters 2695 液质联机(电喷雾电离源、PDA 检测器) 美国 Waters 公司; 868 型 pH 计 美国奥立龙公司; SENCO R-501 旋转蒸发仪 上海申顺生物科技有限公司; Carry 50 紫外-可见分光光度计 美国瓦里安公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 吡咯基丙氨酸的合成

2g 无水乙酸钠溶于 50mL 冰乙酸中, 加入 0.0272mol 的丙氨酸, 溶解后加入等物质的量的 2,5-二甲氧基四氢呋喃回流 40min, 所得物质降到室温后加入 300mL 冰水。过滤, 活性炭脱色。乙酸乙酯萃取, 萃取液水洗两次, 乙酸乙酯溶液旋转蒸发。浓缩液溶于 10g/100mL 氢氧化钾, 用 2mol/L 的盐酸调 pH1~2, 0~4℃ 条件下过夜, 过滤, 滤液用乙酸乙酯萃取, 加入无水硫酸钠静置 10h 去除水分, 旋转蒸干, 所得物质即为吡咯基丙氨酸, 放在干燥器中待结构鉴定。

#### 1.2.2 吡咯基丙氨酸的结构表征

质谱条件: 电离方式: ESI 负离子模式; 毛细管电压: 3.08kV; 锥孔电压: 25~30V; 电离源温度: 110℃; 去溶剂温度: 200℃; 锥孔气流: 氮气, 50L/h; 去溶剂气流: 氮气, 450L/h; 碰撞气体: 氩气; 碰撞气压力: 0.2mPa; 碰撞能量: 0~30eV; 溶剂为无水甲醇。

#### 1.2.3 腊八蒜的制备

将吡咯基丙氨酸溶于体积分数 5% 醋酸中, 配成浓

度分别为 5.0、7.5mmol/L 的溶液。将大蒜剥皮洗净后, 较小的以及有破损的蒜瓣弃去不用, 剩下的用蒸馏水反复冲洗干净。10g 浸泡于 30mL 的上述配好的溶液中以不加吡咯基丙氨酸的体积分数 5% 醋酸为对照。分别在 28℃ 下于不同浸泡天数(1~45d)取出样品。浸泡液离心后用 0.45 μm 膜过滤, 用紫外-可见分光光度计测样。所有实验重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 吡咯基丙氨酸的合成

吡咯基丙氨酸的合成途径如图 1 所示。通过 Paal-Knorr 方法<sup>[10-12]</sup>, 采用丙氨酸为原料提供胺基, 2,5-二甲氧基四氢呋喃提供吡咯环上的其他碳原子, 合成了吡咯基丙氨酸。

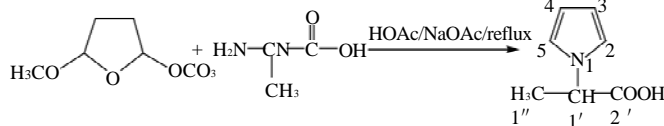
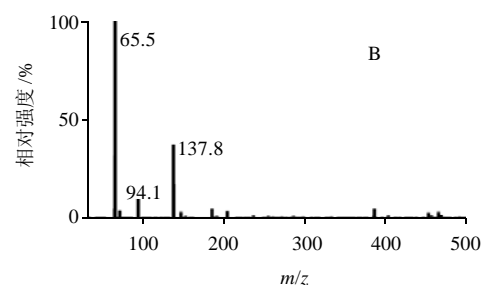
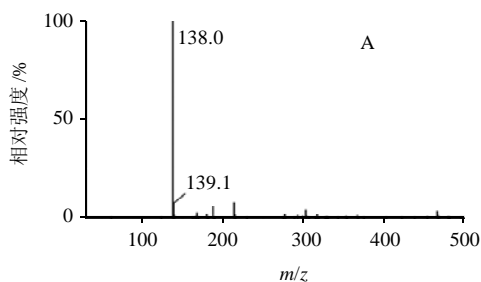


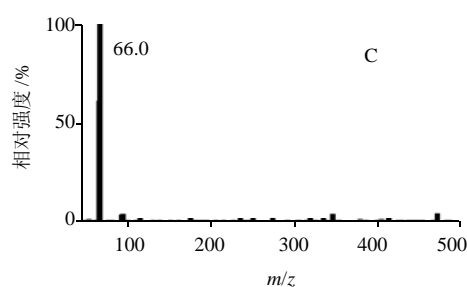
图 1 吡咯基丙氨酸的合成途径

Fig.1 Synthesis pathway of pyrrolyl alanine

由图 1 可知, 此物质与 *N*-(3,4-二甲基)吡咯基丙氨酸化合物的结构非常相似, 均具有吡咯环及丙氨酸的侧链结构, 只是少了 3、4 位的两个甲基, 因为甲基为非功能基团, 因此不影响以后的反应, 可以作为 *N*-(3,4-二甲基)吡咯基氨基酸化合物的模型物。测定其熔点为 69~72℃, 所测的熔点温度误差在 3℃ 之间, 可见此合成的物质纯度较高。

### 2.2 吡咯基丙氨酸的结构表征





A. 碰撞电压为 0eV; B. 碰撞电压为 24eV; C. 碰撞电压为 26eV。

图2 吡咯基丙氨酸的质谱图

Fig.2 MS spectra of pyrrolyl alanine at various collision voltages

吡咯基丙氨酸通过核磁共振光谱、红外光谱、质谱进行结构表征,证明合成的物质为目标物且具有足够的纯度进行下一步的实验。

图2A为锥孔电压为25V,  $m/z=0\sim 500$ 的质谱扫描图,显著的最大吸收峰  $m/z=138$ ,为分子离子峰,由于负离子模式,所以化合物的相对分子质量为139;相对分子质量为奇数,根据氮规则含有奇数个氮原子。 $M+1$ 峰  $m/z=139$ 为碳同位素峰,根据公式:碳的个数= $[(M+1)/M^+]/$ 碳同位素的天然丰度 $=7.56\%/1.08\%=7$ ,计算得出此化合物含有7个碳,以上各分析均与目标化合物相同(相对分子质量为139,含有7个碳原子,一个氮原子)。

为证明其结构的正确,进行MS-MS的质谱分析。吡咯基丙氨酸裂解途径推导如下:

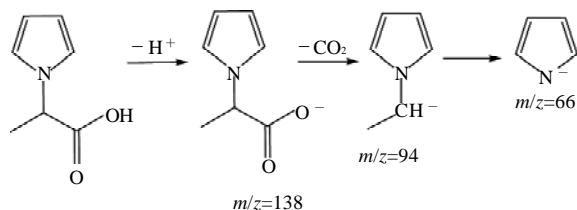


图3 吡咯基丙氨酸的质谱裂解途径

Fig.3 MS fragmentation pathway of pyrrolyl alanine

图2B、2C分别为碰撞能量为24、26eV得到的  $m/z=138$  的子离子图谱。在图2B中,产生了  $m/z=94$ 、66的碎片离子,其中  $m/z=94$  是母离子丢失了  $\text{CO}_2$  基团产生的  $[(M-H-44)]^-$ ,这与渠琛玲等<sup>[13]</sup>的研究结果相符,研究认为在ESI负离子模式下大多数氨基酸都丢失中性碎片  $\text{CO}_2$ 。随着碰撞能量的增加,更多碎片离子出现,在图2C中产生了  $m/z=66$  的新的离子  $[M-H-44-28]^-$ ,此离子

为吡咯基负离子基团,是  $m/z=94$  的碎片离子丢失了亚甲基基团产生的(图3)。随着碰撞能量的增加,  $m/z=66$  的碎片离子丰度增加,而其他离子  $m/z=124$ 、94的离子均裂解为质核比为66的碎片离子(图2C)。所有MS-MS图谱均与推测的结构相符,进一步验证了合成的化合物为目标物。

进一步通过红外、核磁图谱鉴定其精确的分子结构。红外图谱的典型峰列于表1。核磁共振实验中溶解样品的溶剂为氘代二甲基亚砜,虽然为氘代溶剂,但是由于存在少量未被氘代的溶剂,因而在  $\delta=2.50$  处出现溶剂的残存质子吸收峰。其他位置的吸收峰为吡咯基丙氨酸结构中的氢原子的吸收峰(表2)。

表2 吡咯基丙氨酸的<sup>1</sup>H NMR谱数据Table 2 <sup>1</sup>H NMR spectral data of pyrrolyl alanine

氢	H <sub>2,5</sub>	H <sub>3,4</sub>	H <sub>1'</sub>	H <sub>2'</sub>	H <sub>1''</sub>
化学位移(偶合常数),	6.78~6.80,	5.98~5.99,	4.87(7.23Hz),	12.88,	1.57(7.23Hz),
峰数及氢个数	(3,2H)	(3,2H)	(4,1H)	(s,1H)	(d,3H,CH <sub>3</sub> )

由表1可知,红外光谱中  $3125\sim 3100\text{cm}^{-1}$ ,单峰,强峰,为吡咯环上质子的伸缩振动峰;  $1272\sim 1282\text{cm}^{-1}$ ,中强峰,为吡咯环骨架中  $\nu_{\text{C-N}}$  的伸缩振动吸收峰;  $726\sim 730\text{cm}^{-1}$ ,单峰,强峰,为吡咯环中质子  $\delta_{\text{C-H}}$  的面外变形振动吸收峰,证明吡咯环的存在,由于不存在  $\nu_{\text{N-H}}$  的伸缩振动峰,可以确定化合物的氨基酸侧链是在吡咯环中N原子位进行的取代。而其核磁共振氢谱进一步证明吡咯环的存在,其中  $\delta 6.70\sim 6.83$  的两个氢和  $5.93\sim 6.01$  的两个氢分别为吡咯基丙氨酸吡咯环上的氢,其中  $\delta 6.70\sim 6.83$  的两个氢由于与杂原子N相连,N原子具有孤对电子,与其形成  $p-\pi$  共轭,电子转移的结果使  $\alpha$  位的电子也向  $\beta$  位推进,  $\beta$  位上的C和H的电子密度增加,磁屏蔽也增加,产生正屏蔽效应,因而  $\delta$  值减小,相连化学位移相对较低,因此  $\delta$  值较高的两个氢为  $\alpha$  位即2,5位上的氢,  $\delta 6.70\sim 6.83$  的两个氢为3,4位上的氢(表2)。由此可以判断此系列物质中存在吡咯环。

红外光谱:  $1720\text{cm}^{-1}$ ,单峰,强峰,是典型的羧基中  $\nu_{\text{C=O}}$  的伸缩振动形成的峰;  $3500\sim 2400\text{cm}^{-1}$ ,中强峰,宽峰,为羧基中  $\nu_{\text{OH}}$  的伸缩振动峰,因为在溶液里羧基常以二聚体的形式存在,一般情况下  $\nu_{\text{OH}}$  在  $3500\sim 2500\text{cm}^{-1}$  一个较大的范围内以  $3000\text{cm}^{-1}$  为中心有一个宽而散的峰。此吸收在  $2700\sim 2500\text{cm}^{-1}$  常有几个小峰,这是C—O伸缩振动和变形振动的倍频及组合频引起的。由羰基及羟基的吸收峰以及倍频及组合频的吸收峰可

表1 吡咯基丙氨酸的IR谱数据

Table 1 IR spectral data of pyrrolyl alanine

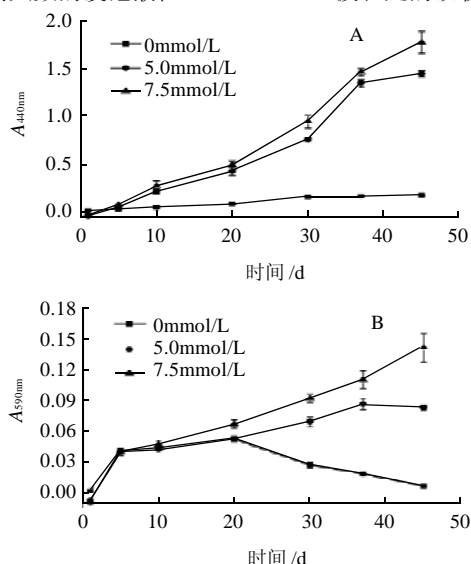
基团	(CH) <sub>2</sub> N	C—N	COOH	CH <sub>2</sub> CHCOOH	CH <sub>3</sub>
峰位置(峰强度,峰形,吸收峰类型)	3125~3100 $\text{cm}^{-1}$ (s, s, $\nu_{\text{C-H}}$ ) 726~730 $\text{cm}^{-1}$ (s, s, $\delta_{\text{C-H}}$ )	1272~1282 $\text{cm}^{-1}$ (s, $\nu_{\text{C-N}}$ )	3500~2400 $\text{cm}^{-1}$ (s, br, $\nu_{\text{OH}}$ ) 1720 $\text{cm}^{-1}$ (s, s, $\nu_{\text{C=O}}$ )	2587 $\text{cm}^{-1}$ (m, $\nu_{\text{C-H}}$ )	2999 $\text{cm}^{-1}$ (s, sh, $\nu_{\text{asC-H}}$ )、2870 $\text{cm}^{-1}$ (s, sh, $\nu_{\text{asC-H}}$ )、1484 $\text{cm}^{-1}$ (m, $\delta_{\text{C-H}}$ )

以确定模型物中羧基的存在,由此证明存在羧基基团;核磁图谱中化学位移在最低场的 $\delta$  12.55~13.01的宽峰为羧基即 $H_2$ 的特征化学位移,因为羧基的羟基连在羰基上,正极化的羰基碳表现出强的吸电子诱导效应,同时羟基的氧由于共轭作用具有推电子作用,两个氧原子起协同效应,羧基氢有被去屏蔽的效应,因此其化学位移在低场,且为单峰,不存在远程耦合,更确定其为羧基峰。由此可以确定此合成的化合物中存在羧基基团,与目标结构相符。

红外光谱中 $2870$ 、 $2999\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰均为强峰,大峰边有小肩峰,为甲基中 $\nu_{\text{asC-H}}$ 的非对称吸收峰; $1484\text{cm}^{-1}$ ,中强峰,为甲基中 $\delta_{\text{C-H}}$ 的变形振动吸收峰,由此可以确定此化合物中存在甲基; $2587\text{cm}^{-1}$ ,中强峰,为次甲基中 $\nu_{\text{C-H}}$ 的伸缩振动峰。核磁光谱中 $\delta$ 1.57,3个氢,为甲基的特征化学位移,双峰,说明存在偶合,邻位碳有一个氢,且耦合常数为 $7.53\text{Hz}$ ,推测为 $\text{CHCH}_3$ 即 $H_{1'}$ 。 $\delta$ 4.87,1个H,化学位移较高,单峰,不存在偶合,推测为次甲基上的氢, $\text{CHCH}_3$ 即 $H_{1'}$ 。图谱中无其他峰,所以推测吡咯基丙氨酸的结构为1-(1'-羧基-乙基)吡咯,合成的物质为目标物。

### 2.3 吡咯基丙氨酸的增色作用研究

研究表明腊八蒜的绿色素由黄色素和蓝色素组成,其相应的紫外-可见吸收峰在 $440\text{nm}$ 和 $590\text{nm}$ <sup>[2,14-15]</sup>,因此选作 $440\text{nm}$ 和 $590\text{nm}$ 为检测波长,测量浸泡不同天数的腊八蒜浸泡液的色素生成情况。加入上述合成的吡咯基丙氨酸浸泡不同天数的浸泡液在 $440$ 、 $590\text{nm}$ 波长处的吸收峰见图4。



吡咯基丙氨酸浓度分别为0(对照)、5.0、7.5mmol/L。

图4 5%醋酸浸泡液不同天数紫外-可见分光光谱图

Fig.4 Absorbance at 440 nm and 590 nm of 5% acetic acid solution containing pyrrolyl alanine at various concentrations during different storage periods

由图4A可知,加入不同浓度的吡咯基丙氨酸和对照随着浸泡时间的延长,黄色素的吸收峰均在不断的增加,加入吡咯基丙氨酸后,黄色素吸光度的增长速度

明显高于对照,且浓度越大,增长速度越大。这说明吡咯基丙氨酸的加入能够使腊八蒜生成更多的黄色素。由图4B可知,对照在 $590\text{nm}$ 波长处的吸收峰先增加后下降,这与Bai等<sup>[2]</sup>的研究结果相吻合,腊八蒜的蓝色素随着浸泡时间的延长会逐渐降解,到45d时蓝色素的吸收峰降解到只有最高吸收峰时的13.4%,而加入吡咯基丙氨酸的样品蓝色素的吸收峰一直在增加,到45d时5.0、7.5mmol/L的吸收峰分别为0.083和0.141,且仍然呈现增加趋势。加入浓度越大的吡咯基丙氨酸产生的蓝色素越多。由此可见加入吡咯基丙氨酸的样品比对照具有明显的延长色素形成的作用,能够起到增色作用。

### 3 结论

3.1 采用Paal-Knorr方法,通过回流、萃取、调等电点、重结晶等手段合成吡咯基丙氨酸。

3.2 通过核磁共振、红外光谱、质谱鉴定其化学结构,证明此合成物为目标化合物吡咯基丙氨酸。

3.3 加入5.0mmol/L的吡咯基丙氨酸能够增加腊八蒜绿色素的形成,维持其商品性状至少45d,且此时色素的形成仍呈上升趋势,吡咯基丙氨酸对腊八蒜具有增色作用。

### 参考文献:

- [1] JOSLYN M A, SANO T. The formation and decomposition of green pigment in crushed garlic tissue[J]. Food Research, 1956, 21(2): 170-183.
- [2] BAI Bing, CHEN Fang, WANG Zhengfu, et al. Mechanism of the greening color formation of "laba" garlic, a homemade Chinese food product[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 7103-7107.
- [3] 赵晓丹, 傅达奇, 王萍, 等. 腊八蒜绿变色素的分离提取[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(10): 129-131.
- [4] IMAI S, AKITA K, TOMOTAKE M, et al. Identification of two novel pigment precursors and a reddish-purple pigment involved in the blue-green discoloration of onion and garlic[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006a, 54: 843-847.
- [5] JOSLYN M A, PETERSON R G. Redding of white onion tissue[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1960, 8: 72-76.
- [6] KUBEC R, VELISEK J. Allium discoloration: the color-forming potential of individual thiosulfonates and amino acids: structural requirements for the color-developing precursors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 3491-3497.
- [7] KUBEC R, HRBÁCOVÁ M, MUSAH R A, et al. Allium discoloration: precursors involved in onion pinkening and garlic greening[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 5089-5094.
- [8] 江英, 胡小松, 廖小军. 有关蒜泥绿色素形成的反应[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 31-35.
- [9] IMAI S, AKITA K, TOMOTAKE M, et al. Model studies on precursor system generating blue pigment in onion and garlic[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006b, 54: 848-852.
- [10] 范文廷, 陈立佛, 彭秀芳, 等. 含N-乙酰基或N-β-羟乙基吡咯的合成[J]. 北京大学学报:自然科学版, 1984(2): 35-39.
- [11] GLOEDE J, PODUKA K, GROSS H, et al. Amino acids and peptides. LXXIX. α-Pyrrolo analogues of α-amino acids[J]. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 1968, 33: 1307-1314.
- [12] SIRCAR I, WINTERS R T, QUIN III J, et al. Nonpeptide angiotensin receptor antagonists. I. Synthesis and *in vitro* structure-activity relationships of 4-[[[(1H-pyrrol-1-ylacetyl) amino] phenyl] methyl] imidazole derivatives as angiotensin receptor antagonists[J]. Journal of Medicinal and Chemistry, 1993, 36: 1735-1745.
- [13] 渠琛玲, 张寒琦, 张华蓉, 等. 电喷雾质谱法研究氨基酸的质谱碎裂及其与人参皂苷Rb<sub>3</sub>的相互作用[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(9): 1721-1726.
- [14] BAI Bing, LI Lei, HU Xiaosong, et al. Increase in the permeability of tonoplast of garlic (*Allium sativum*) by monocarboxylic acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54: 8103-8107.
- [15] LEE E J, CHO J E, KIM J H, et al. Green pigment in crushed garlic (*Allium sativum* L.) cloves: purification and partial characterization[J]. Food Chemistry, 2007, 101: 1677-1686.