RÉSOLUTION OIV/OENO 345/2009

DOSAGE DU GLUTATHION DANS LES MOUTS ET LES VINS PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

VU l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission « Méthodes d'analyse »,

DECIDE de compléter l'annexe A du *Recueil International des méthodes d'analyse* par la méthode de type IV suivante:

Titre	Type de la méthode
Dosage du glutathion dans les moûts et les vins par électrophorèse capillaire	IV

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage du glutathion dans les moûts et les vins dans une gamme de concentration de 0 à 40 mg/L. Elle utilise l'électrophorèse capillaire (EC) couplée à une détection fluorimétrique (LIF).

2. Principe

La méthode utilisée, qui procède par électrophorèse capillaire, est adaptée de celle mise au point par Noctor et Foyer (1998) pour doser les thiols non volatils dans les feuilles de peuplier par HPLC couplée à une détection fluorimétrique.

La séparation des solutés d'un mélange par électrophorèse capillaire est obtenue par migration différentielle dans un électrolyte. Le capillaire est rempli avec cet électrolyte.

L'échantillon à séparer est injecté à l'une des extrémités du capillaire. Sous l'action du champ électrique généré par les électrodes plongées dans l'électrolyte, les solutés se séparent par différence de vitesse de migration et sont détectés à proximité de l'autre

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

extrémité du capillaire sous forme de pics. Dans des conditions opératoires données, les temps de migration constituent un critère d'identification des espèces chimiques et la surface du pic est proportionnelle à la quantité injectée.

3. Produits et réactifs

3.1. Liste des produits

3.1.1. Glutathion (GSH, > 98 %),

3.1.2. Dithiothréitol (DTT, >99 %),

3.1.3. Phosphate de sodium monobasique anhydre (NaH_2PO_4, >99 %)

3.1.4. Phosphate de sodium dibasique anhydre (Na_2HPO_4, >99 %)

3.1.5. Acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonic (CHES, >98 %),

3.1.6. Monobromobimane (MBB, 97 %)

3.1.7. Sel de sodium d'acide d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA, >99 %)

3.1.8. Hydroxyde de sodium

3.1.9. Acide chlorhydrique (35 %)

3.1.10. Acétonitrile (99,5 %)

3.1.11. Eau ultrapure de résistivité >18 M□.cm.

3.2. Liste des solutions

Chacune des solutions est homogénéisée avant toute utilisation

3.2.1. Tampon électrophorétique : tampon phosphate, 50 mM, pH 7

Ce tampon est préparé à partir de deux solutions A et B

3.2.1.1. Solution A : 3 mg de phosphate monobasique anhydre (3.1.3) repris dans 250 mL d'eau ultra pure (3.1.11)

3.2.1.2. Solution B : 3,55 mg de phosphate dibasique anhydre (3.1.4) repris dans 250 mL d'eau ultra pure (3.1.11)

Le tampon phosphate est obtenu par addition de 40 ml de la solution A (3.2.1.1) et 210 mL de la solution B (3.2.1.2), complété à 500 mL par de l'eau ultra pure (3.1.11). Le pH du tampon est alors ajusté à 7 par de l'acide chlorhydrique (3.1.9).

3.2.2. Solution de monobromobimane (MBB), 50 mM

25 mg de monobromobimane (MBB) (3.1.6) sont repris par 1850 µL d'acétonitrile (3.1.10).

Conservé à - 20 °C à l'abri de la lumière, le réactif est stable durant trois mois.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

3.2.3. Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.

0,4 g d'hydroxyde de sodium (3.1.8) sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml et repris par

100 mL d'eau ultra pure (3.1.11).

3.2.4. Solution d'hydroxyde de sodium 5 M.

20 g d'hydroxyde de sodium (3.1.8) sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml et repris par

100 mL d'eau ultra pure (3.1.11).

3.2.5. Tampon CHES : 0,5 M, pH 9,3

2,58 g d'acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonic (CHES) (3.1.5) sont dissous dans environ 20 ml d'eau ultra pure (3.1.11). Le pH du tampon est ajusté à 9,3 par addition d'hydroxyde de sodium 5 M (3.2.4) puis le volume est ajusté à 25 ml par de l'eau ultra pure (3.1.11). Ce tampon est réparti dans des tubes de 1,5 mL (type Eppendorf) à raison de 1 ml par tube.

La solution aqueuse de CHES, placée à - 20°C, peut être conservée durant plusieurs mois.

3.2.6. Solution de dithiothréitol (DTT), 10 mM

15,4 mg de dithiothréiol (3.1. 2) sont dissous dans 10 mL d'eau ultra pure (3.1.11) puis cette solution est répartie dans des tubes de 1,5 mL (type Eppendorf) à raison de 1 ml par tube.

La solution aqueuse de DTT, placée à - 20°C, peut être conservée durant plusieurs mois.

4. Appareillage

4.1. L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire munie d'un injecteur de type hydrostatique est couplée à un détecteur de fluorescence induite par laser ayant une longueur d'onde d'excitation proche de la longueur d'onde d'absorption de l'adduit MBB-GSH : ex = 390 nm (par exemple, détecteur Zetalif).

4.2. Le capillaire

La longueur totale du capillaire en silice non greffée est de 120 cm, la longueur efficace est de

105 cm, le diamètre interne est de 30 µm.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

5. Préparation des échantillons

La méthode de dosage utilisée met en jeu la dérivatisation des fonctions SH par le monobromobimane (MBB) (Radkowsky et Kosower, 1986). Les échantillons de moûts ou de vins bruts sont clarifiés par centrifugation avant d'être analysés. Les vins en bouteille sont analysés sans clarification préalable.

Préparation des échantillons :

Dans un tube de 1,5 mL (type Eppendorf) placer successivement :

- 200 µl d'échantillon,
- 10 µl de la solution de DTT (3.2.4) ; concentration finale 0,25 mM.
- 145 µl de CHES (3.2.5) ; concentration finale 179 mM.
- 50 µl de MBB (3.2.2) ; concentration finale 6,2 mM.

Après agitation du mélange réactionnel, la dérivatisation des fonctions thiols par le MBB nécessite 20 min d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante. Dans ces conditions analytiques, les dérivés MBB-SR ainsi formés sont peu stables ; le dosage par EC-LIF doit être effectué immédiatement après la période d'incubation.

6. Mode opératoire

6.1. Conditionnement du capillaire

Avant sa première utilisation et dès que les temps de migration augmentent, le capillaire (4.2) doit être conditionné de la façon suivante :

6.1.1. rinçage à l'hydroxyde de sodium 0,1 M (3.2.5) pendant 3 min,

6.1.2. rinçage à l'eau ultra pure (3.1.12) pendant 3 min,

6.1.3. rinçage par le tampon phosphate électrophorétique (3.2.1) pendant 3 min.

6.2. Conditions de migration

6.2.1. L'injection de l'échantillon est de type hydrostatique ; 3 s à 5 kPa.

Elle est suivie d'une injection de tampon électrophorétique (3.2.1) 50 mb afin d'améliorer la résolution des pics (Staking).

6.2.2. Analyse.

La tension de + 30 kV, appliquée tout au long de la séparation, génère un courant de 47

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

µA. Ces conditions sont atteintes en 20 s. La séparation est effectuée à une température constante de 21°C.

6.2.3. Rinçage du capillaire

Le capillaire doit être rincé après chaque analyse successivement par :

- L'hydroxyde de sodium 0,1 M (3.2.3) pendant 3 min,
- L'eau ultra pure (3.1.12) pendant 3 min,
- Le tampon phosphate électrophorétique (3.2.1) pendant 3 min.

7. Résultats

A la concentration finale utilisée dans l'échantillon, la présence de DTT durant la dérivatisation permet de stabiliser les fonctions thiols instables à pH alcalin et très facilement oxydables par les quinones, produits de l'auto-oxydation des composés phénoliques, mais ne rompt pas les ponts disulfures. En effet, dans ces conditions analytiques, la teneur en glutathion réduit (GSH) retrouvée dans un vin additionné ou non de glutathion oxydé (GSSG) à raison de 10 mg/L est strictement comparable (Figure 1). Cette méthode permet par conséquent de doser le glutathion sous sa seule forme réduite.

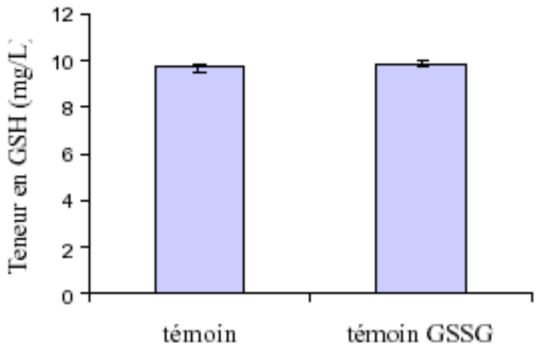


Figure 1 : Mise en évidence de la stabilité des ponts disulfures dans les conditions de dérivatisation décrites. (DTT, 0,25 mM final).

La figure 2 présente le profil électrophorétique d'un échantillon de moût de raisin blanc, cépage Sauvignon, dans lequel sont identifiés la cystéine, le glutathion, la N-acétyl-cystéine et le dioxyde de soufre. Le premier pic correspond aux réactifs en

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

excès (DTT, MBB). La séparation des thiols non volatils est effectuée en moins de 20 minutes. Parmi tous les pics, seuls certains ont pu être identifiés (figure 2, A) (Newton et al., 1981). Ces thiols, hormis le dioxyde de soufre, sont généralement présents en quantités variables dans les baies de raisins (Cheynier et al., 1989), les fruits et les légumes (Mills et al., 2000).

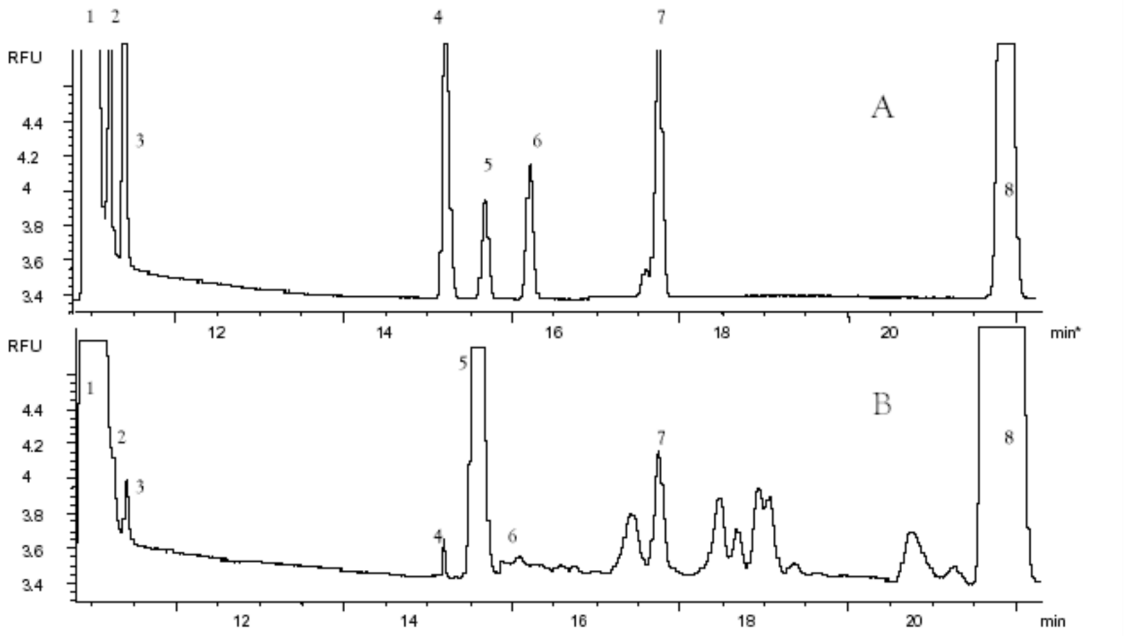


Figure 2: Exemple de séparation des thiols non volatils connus dans une solution HCl/EDTA (A) 1 et dans un moût de raisin (B): DTT ; 2 : homocystéine ; 3 : cystéine ; 4 : Cys-Gly ; 5 : GSH ; 6 : g Glu-Cys ; ,7 : NAC ; 8 : SO_2.

Dans ces conditions analytiques, les temps de rétention des adduits MBB-RS sont les suivants : MBB-homocystéine 10,40 min; MBB-cystéine 10,65 min, MBB-GSH 14,14 min ; MBB-NAC 15,41min ; MBB-SO2 18,58min.

8. Caractéristiques de la méthode

Certains éléments de validation internes ont été déterminés mais il ne s'agit pas d'une validation formelle selon le protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performances des méthodes d'analyse (OIV 6/2000)

Le vin est utilisé comme matrice pour réaliser les courbes d'étalonnage et les tests de

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

répétabilité de chaque composé.

Chaque concentration est calculée à partir de la moyenne de trois déterminations obtenues en utilisant la droite de régression de la courbe d'étalonnage.

Les résultats sont exprimés en mg/L.

Les régressions linéaires et les coefficients de corrélation sont calculés selon la méthode des moindres carrés. Les solutions mères des différents thiols sont réalisées à partir d'une solution d'HCl/EDTA permettant de les conserver sans perte plusieurs jours à + 6°C. Des dilutions successives de ces solutions permettent d'estimer le seuil limite de détection dans le vin, pour un rapport signal sur bruit supérieur ou égal à trois.

La gamme de linéarité est variable selon les thiols (Tableau 1).

Tableau 1 : gamme de linéarité, propriétés des régressions linéaires propres à chaque thiol en solutions préparées de façon identique à celle du glutathion

	Gamme de linéarité	Régression linéaire	Coefficient de corrélation
Homocystéine	0 - 15 mg/l	Y= 0.459X – 0.231	0,9987
Cystéine	0 - 15 mg/l	Y = 0.374X – 0.131	0,9979
Glutathion	0 - 40 mg/l	Y = 0.583X – 0.948	0,9966
N-acétyl-cystéine	0 - 10 mg/l	Y = 0.256X – 0.085	0,9982

Les conditions d'analyses permettent d'éliminer les interférences provoquées par les produits d'hydrolyse du MBB, contrairement à ce qui est signalé dans d'autres travaux (Ivanov et al., 2000).

La répétabilité de la méthode est calculée à partir de dix analyses d'un même échantillon de vin. Pour une concentration en thiols de 10 mg/l, le coefficient de variation est de 6,0 % pour le glutathion ; par ailleurs, il est de 3,2 % pour l'homocystéine, 4,8 % pour la cystéine, et 6,4 % pour la N-acétyl-cystéine.

La limite de détection du glutathion est de 20 µg/l, la limite de quantification est de 60 µg/l.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009

9. BIBLIOGRAPHIE

1. Noctor, G. and C. Foyer, 1998. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione, *Analytical Biochemistry*, **264**, 98-110.
2. Kosower, N.S., Kosower E. M., Newton G. L.,and Ranney H. M., 1979. Bimane fluorescent labels: Labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76** (7), 3382-3386.
3. Newton, G.L., R. Dorian, and R.C. Fahey, *Analysis of biological thiols: derivatisation with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography.* Anal. Biochem., 1981. **114**: p. 383-387.
4. Cheynier, V., J.M. Souquet, and M. Moutounet, 1989. Glutathione content and glutathione to
5. hydroxycinnamique acid ration in Vitis vinifera grapes and musts*. Am. J.Enol.Vitic*,. **40** (4), 320-324.
6. Mills, B.J., Stinson C. T., Liu M. C. and Lang C. A., 1997. Glutathione and cyst(e)ine profiles of vegetables using high performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Journal of food composition and analysis,* **10**, 90-101.
7. Ivanov, A.R., I.V. Nazimov, and L. Baratova, 2000. Determination of biologically active low molecular mass thiols in human blood*. Journal of Chromatogr. A*,. **895**, 167-171.

Exemplaire certifié conforme Zagreb, 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2009