

DIVERSES APPLICATIONS DE L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE À L'ANALYSE DES VINS. DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES ET INORGANIQUES, DE CATIONS MINÉRAUX, DES ACIDES AMINÉS ET AMINES BIOGÈNES

SEVERAL APPLICATIONS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR WINES ANALYSIS. QUANTITATION OF ORGANIC AND INORGANIC ACIDS, INORGANIC CATIONS, AMINO ACIDS AND BIOGENIC AMINES

M. ARELLANO*, ** N. SIMÉON**, PUIG Ph.* et F. COUDERC***

*Laboratoire de Bromatologie et d'Œnologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université P. Sabatier, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse (France)

**Zeta Technologie, 10 avenue de l'Europe, 31520 Ramonville (France)

***I.B.G.C., Université P. Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex (France)

Abstract : Capillary electrophoresis is now a well known analytical mean for the analysis of a great number of different molecules in miscellaneous media. Its usefulness is relatively unknown in oenology.

In this application note, we present the simultaneous analysis of organic and inorganic acids. Inorganic cations were also analysed. In both cases the detection was indirect-UV mode.

Amino acids and biogenic amines were also separated and quantitated after derivation of the wine using the fluorescein isothiocyanate and laser induced fluorescence detection. Twenty eight amino acids and biogenic amines were identified in the same run.

The relative standard deviations of migration time and peak area allow very easy identification of the species and accurate quantitations.

Mots clés : électrophorèse capillaire, détection UV indirecte, anions, cations, amines, acides aminés, amines biogènes, fluorescence induite par laser, vin

Key words : capillary electrophoresis, indirect UV detection, anions, cations, amino acids, amines, biogenic amines, laser-induced fluorescence, wine

INTRODUCTION

L'électrophorèse capillaire (EC) est maintenant bien connue comme étant un mode d'analyse rapide, fiable, automatique, d'utilisation simple, peu coûteuse en consommable et s'adressant à une grande variété de molécules. Ainsi acides aminés (CHENG et DOVICH, 1988), amines (RIVIELLO et HARROLD, 1994), protéines (SCHÖNEICH *et al.*, 1993), acides organiques (SHAMSI et DANIELSON, 1994), acides minéraux (FORET *et al.*, 1990), cations minéraux (FORET *et al.*, 1990), sucres (OEFNER *et al.*, 1993), nucléotides (BABA *et al.*, 1992) ont été analysés tant dans des échantillons biologiques que dans des produits issus de l'industrie agro-alimentaire.

Quelques travaux récents ont montré que son utilisation en œnologie permettait l'analyse automatique d'un grand nombre d'échantillons pour l'analyse d'ions (LEVI *et al.*, 1993). Dans cet article, nous examinons diverses applications de l'électrophorèse capillaire utilisant la détection par absorption UV indirecte, ou la fluorescence induite par laser. Le premier mode de détection est utilisé pour l'étude d'anions organiques et minéraux, et de cations minéraux. Le deuxième mode

de détection est utilisé pour l'étude d'amines biogènes et d'acides aminés.

ANALYSES D'IONS ORGANIQUES ET MINÉRAUX

I — PRINCIPE DE L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE - DÉTECTION U.V. INDIRECTE

En EC les espèces injectées dans le capillaire de silice fondue se déplacent selon leur mobilité électrophorétique et sous l'effet du flux électroosmotique dus à l'imposition d'un champ électrique. Si l'on introduit dans l'électrolyte tampon remplissant le capillaire un ion chromophore de mobilité électrophorétique proche des espèces à identifier (qui n'absorbent pas en UV), les espèces séparées se répartissent dans des zones dans lesquelles le chromophore fait défaut. Ainsi on obtient un électrophérogramme avec une ligne de base présentant une absorption non nulle tandis que les espèces ont une absorption moindre qui tend vers 0. L'électrophérogramme se présente donc comme un tracé ayant des pics négatifs. Certains systèmes informatiques permettent de présenter un électrophé-

gramme plus usuel en inversant le tracé obtenu, par rapport à l'horizontale.

II — ANALYSE D'ACIDES ORGANIQUES ET MINÉRAUX

L'analyse des acides organiques et inorganiques dans les boissons revêt une importance particulière pour connaître l'évolution des phénomènes de fermentation, la stabilité du produit et l'authenticité des jus. Elle permet, en outre, d'étudier les propriétés organoleptiques des produits fermentés. De multiples approches analytiques sont aujourd'hui utilisées, parmi lesquelles la chromatographie liquide échangeuse d'ions et détection par conductimétrie est une des plus répandue (TARTER, 1987). De plus, l'électrophorèse capillaire et la détection par absorption UV inverse est une alternative séduisante à l'analyse de tels ions et divers électrolytes de séparation ont été proposés (LI et LI, 1994). Au laboratoire, nous avons mis au point, en EC, un mode de séparation simultané des acides organiques

et minéraux qui nous a permis d'étudier divers échantillons de vins. Auparavant, ce type d'analyse, en CE, nécessitait l'utilisation de deux électrolytes de séparation différents, et donc de deux séparations différentes l'une pour les acides organiques l'autres pour les anions minéraux. L'analyse de ces ions, mise ici en œuvre, a une durée maximum de 13 minutes. Les déviations standards relatives des dosages sont inférieures à 1,72 p. cent (tableau I), ce qui permet un dosage précis de ces composés, et de moins de 0.54 p. cent pour les temps d'élution, ce qui permet une reconnaissance automatique des divers composés par le système d'acquisition de données. Ainsi ce système permet le dosage en routine de très nombreux échantillons. La figure 1 représente un électrophérogramme obtenu.

III — ANALYSE DE CATIONS

Les cations, associés à certains acides organiques, contribuent à la fraîcheur et à la saveur des vins (PEYNAUD, 1984), leur dosage permet de connaître

TABLEAU I
Déviations standards relatives des temps de migrations et des surfaces des cations, anions, acides aminés ou amines biogènes, analysés par électrophorèse capillaire.

Table I — Relative standard deviations of migration times and areas of cation, anions, amino acids and biogenic amines, analysed using capillary electrophoresis.

Produit	DSR TM (p. cent)	DSR surface (p. cent)	Produit	DSR TM (p. cent)	DSR surface (p. cent)
chlorure	0,03	1,52	succinate	0,07	1,72
sulfate	0,07	1,43	citrate	0,34	1,18
tartrate	0,06	0,95	acétate	0,30	1,17
malate	0,06	1,41	lactate	0,54	1,13
potassium	0,05	1,34	sodium	0,08	1,53
calcium	0,05	1,43	magnésium	0,07	1,56
putrescine	0,41	1,78	leucine-isoleucine	0,59	2,34
arginine	0,47	1,67	proline	0,58	1,56
lysine	0,45	1,79	phénylalanine- valine	0,67	2,87
histamine	0,41	1,56	tryptophane	0,66	1,65
ornitine	0,43	1,59	asparagine	0,67	1,78
histidine	0,49	1,65	tyrosine	0,69	1,56
éthanolamine	0,49	1,67	sérine	0,73	1,34
éthylamine	0,48	1,89	alanine	0,71	1,29
tyramine	0,56	1,34	cystéine	0,75	1,78
β-phénylamine	0,49	1,57	taurine	0,77	1,56
ammonium	0,51	1,89	glycine	0,72	1,67
spermidine	0,56	2,01	acide glutamique	0,79	1,69
spermine	0,53	1,67	acide aspartique	0,83	1,72
thréonine	0,55	1,98	acide cystéique	0,75	1,74

DSR : déviation standard relative, TM : temps de migration

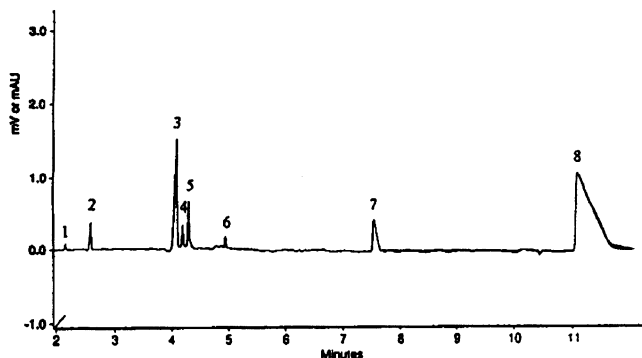


Fig. 1 — Analyse des anions organiques et inorganiques d'un vin rouge par électrophorèse capillaire et détection par absorption UV inverse.

1 : chlorure, 2 : sulfate, 3 : tartrate, 4 : malate, 5 : succinate, 6 : citrate, 7 : acetate, 8 : lactate.

Fig. 1 — Analysis of organic and inorganic acids in a red wine by capillary electrophoresis and indirect UV detection.

1 : chloride, 2 : sulphate, 3 : tartrate, 4 : malate, 5 : succinate, 6 : citrate, 7 acetate, 8 : lactate.

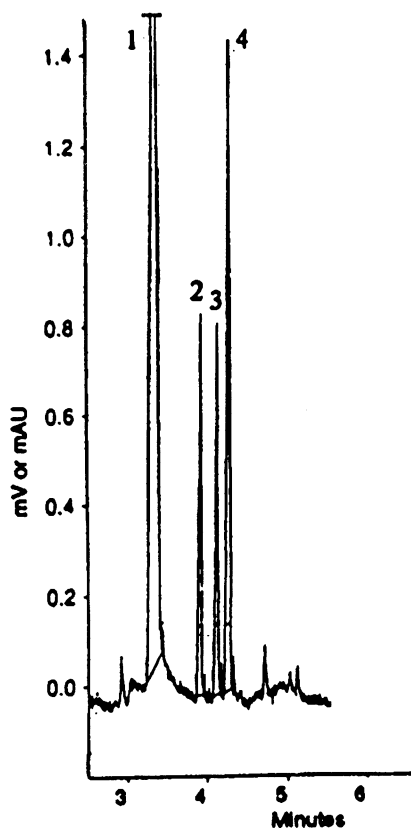


Fig. 2 — Analyse des cations inorganiques d'un vin rouge par électrophorèse capillaire et détection par absorption UV inverse

1 : potassium, 2 : calcium, 3 : sodium, 4 : magnésium

Fig. 2 — Analysis of inorganic cations in a red wine, by capillary electrophoresis and indirect UV detection

1 : potassium, 2 : calcium, 3 : sodium, 4 : magnesium

l'influence climatique sur la vigne et le raisin. L'électrophorèse capillaire et la détection par absorption UV inverse a été aussi largement utilisée pour l'analyse des cations dans le vin (ARELLANO *et al.*, 1997). La figure 2 représente un électrophérogramme dans lequel sodium, potassium, magnésium et calcium sont séparés. Les déviations standards relatives de ces composés sont aussi bonnes que précédemment.

ANALYSE D'ACIDES AMINÉS ET D'AMINES BIOGÈNES PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE ET DÉTECTION DE FLUORESCENCE INDUITE PAR LASER

I — PRINCIPE DE L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE - DÉTECTION DE FLUORESCENCE INDUITE PAR LASER

La fluorescence est une méthode de détection de composés bien connue. Afin de pouvoir étudier des amines ou acides aminés qui n'ont pas, de façon générale, de spectre de fluorescence, il faut dériver ces substances par un fluorophore. La fluorescence induite par laser permet grâce à la radiation cohérente de concentrer sur une très petite surface toute l'énergie lumineuse (plusieurs milliwatts) du faisceau laser. Ainsi, comparée à la fluorescence conventionnelle, l'énergie lumineuse excitatrice est 1 000 à 10 000 fois plus intense et permet d'étudier de très faibles concentrations, 100 à 1 000 fois plus faibles que celles identifiables en fluorescence conventionnelle.

Les acides aminés interviennent pendant la croissance des levures et des bactéries lors de la fermentation. Ces acides aminés sont convertis par certaines bactéries en amines biogènes qui peuvent donner au vin un goût désagréable (spermine, spermidine, cadaverine, putrescine...) ou causer certaines pathologies (histamine, tyramine).

Nous avons travaillé au laboratoire sur la mise au point d'analyse d'acides aminés et d'amines biogènes par électrophorèse capillaire et détection par fluorescence induite par laser. L'avantage de cette technique de détection, comparée à la détection par absorption U.V., est qu'elle permet de simplifier les électrophérogrammes. En effet, la figure 3 montre un électrophérogramme d'un vin dont les amines ou acides aminés sont dérivés avec du chlorure de dansyle et détectés par absorptiométrie à 320 nm. La complexité de la composition du vin et la multitude de composés absorbant à 320 nm font que l'électrophérogramme obtenu est difficilement interprétable et seulement quelques acides aminés peuvent être identifiés. Afin d'améliorer la sélection

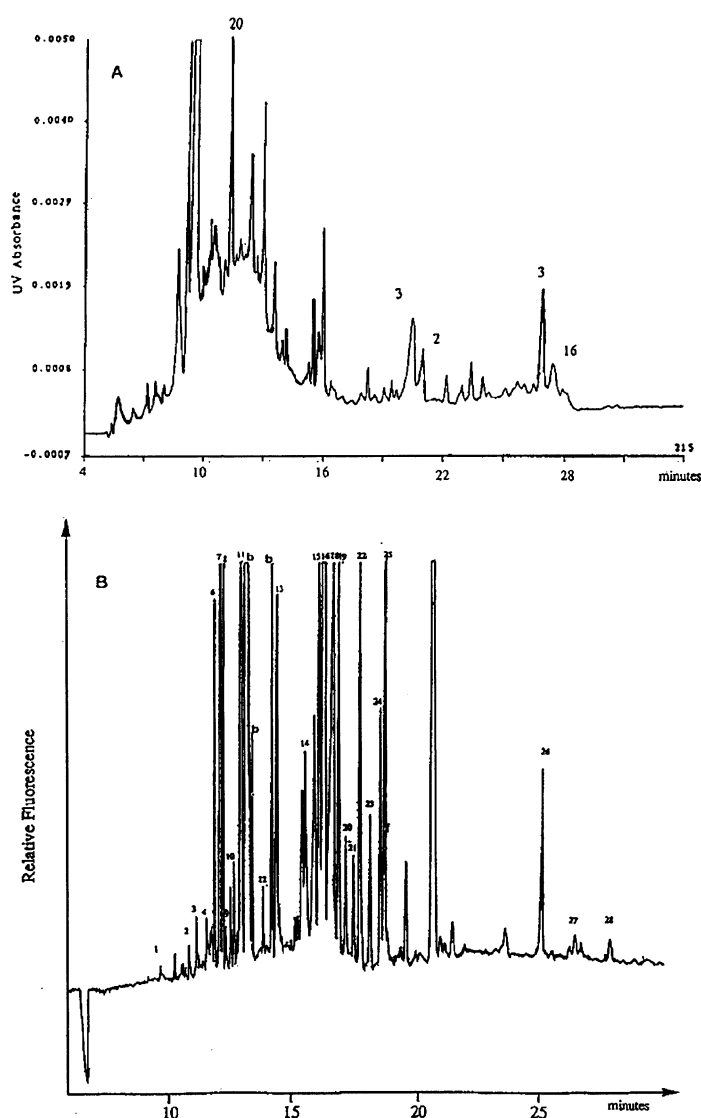


Fig. 3 — Analyse des acides aminés et amines biogènes dans un vin rouge par électrophorèse capillaire.

A : Détection UV (320 nm) du vin dérivé avec du chlorure de dansyle

B : Détection par fluorescence induite par laser (488 nm) du vin dérivé avec du FITC et dilué 5 000 fois.

1 : putrescine, 2 : arginine, 3 : lysine, 4 : histamine, 5 : ornithine, 6 : histidine, 7 : éthanolamine, 8 : éthylamine, 9 : tyramine, 10 : β -phénylalanine, 11 : ammonium, 12 : spermidine, 13 : spermine, 14 : thréonine, 15 : leucine-isoleucine, 16 : proline, 17 : phénylalanine-valine, 18 : tryptophane, 19 : asparagine, 20 : tyrosine, 21 : sérine, 22 : alanine, 23 : cystéine, 24 : taurine, 25 : glycine, 26 : acide glutamique, 27 : acide aspartique, 28 : acide cystéique, b : pics dus au FITC.

Fig. 3 — Analysis of amino-acids and biogenic amines by capillary electrophoresis.

A : UV détection (320 nm) of labelled wine with dansyl chloride.

B : Laser induced fluorescence détection (488 nm) of labelled wine with FITC and diluted 5 000 times.

1 : putrescine, 2 : arginine, 3 : lysine, 4 : histamine, 5 : ornithine, 6 : histidine, 7 : ethanolamine, 8 : ethylamine, 9 : tyramine, 10 : β -phenylalanine, 11 : ammonium, 12 : spermidine, 13 : spermine, 14 : threonine, 15 : leucine-isoleucine, 16 : proline, 17 : phenylalanine-valine, 18 : tryptophane, 19 : asparagine, 20 : tyrosine, 21 : serine, 22 : alanine, 23 : cysteine, 24 : taurine, 25 : glycine, 26 : glutamic acid, 27 : aspartic acid, 28 : cysteic acid, b : shows FITC peaks.

tivité de la détection et le pouvoir de séparation, nous avons utilisé la dérivation des amines biogènes et des acides aminés par la fluorescéine isothiocyanate, puis la détection fluorescence induite par laser (excitation 488 nm) comme mode de détection. Ceci permet de détecter uniquement les substances fluorescentes à la longueur d'onde d'excitation et de pouvoir diluer l'échantillon, plusieurs milliers de fois afin d'accroître le pouvoir séparateur de l'électrophorèse capillaire et donc de pouvoir séparer un plus grand nombre de composés. La figure 3b montre un électrophérogramme de vin de Cahors de 1986, dilué 5000 fois après dérivation et dans lequel on identifie et on dose 28 acides aminés ou amines en moins de 25 minutes. Les déviations standards relatives, des dosages sont inférieures à 3 p. cent (tableau I) ce qui permet un dosage précis de ces composés, et de moins de 0,9 p. cent pour les temps d'élution ce qui permet une reconnaissance automatique des divers composés par le système d'acquisition de données.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

I — ÉTUDE DU VIN PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE ET DÉTECTION PAR UV INVERSE

Cette étude a été effectuée grâce à un système d'électrophorèse capillaire couplé à un détecteur ultraviolet (Dual Impact, Europhor Instruments maintenant Zeta Technology Ramonville, Toulouse, France). Les séparations, aussi bien pour les acides organiques et inorganiques que pour les cations minéraux, ont été réalisées dans un capillaire de silice fondue de 75 μ m de diamètre interne et de 44 cm de longueur. Les solutions standards sont préparées à partir de composés chimiquement purs à des concentrations représentatives de celles retrouvées dans les vins. Après dilutions successives, ces solutions ont été utilisées pour obtenir les courbes de calibration de chaque composé.

Le tampon de séparation des acides organiques et inorganiques est constitué d'un chromophore, l'acide pyromellitique à 3 mM et d'un modificateur de flux électroosmotique, la diéthylènetriamine à 3 mM. Le pH de la solution est amenée à 7,5 avec du tampon Tris 1M. Une tension de -20 kV est appliquée au système qui se trouve à une température constante de 30 °C. Les échantillons, après dilution au 1/50^e, sont injectés de manière hydrodynamique pendant 2 s ce qui correspond à un volume d'injection de 8 nL. Les molécules sont détectées par UV inverse à 220 nm.

Le tampon de séparation des cations minéraux est constitué d'un chromophore, la créatinine à 10 mM et d'un éther couronne, le 18 Crown 6 à 2 mM, qui permet la séparation des ions ammonium et potassium

(SHI et FRITZ, 1994). Le pH de la solution est amené à 4,1 avec de l'acide propionique et de l'acide lactique. Une tension de +12 kV est appliquée au système. La température d'analyse est de 25°C. Les échantillons dilués au 1/50^e sont injectés de manière hydrodynamique pendant 2 s. Les molécules sont détectées par UV inverse à 230 nm.

II — ÉTUDES DU VIN PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE - FLUORESCENCE INDUITE PAR LASER

Un injecteur et source de haute tension Phoeris 100 (Zeta Technology) a été utilisé connecté à un détecteur de fluorescence induite par laser (Zeta Technology). Le tampon de séparation est 20 mM SDS 100 mM acide borique à pH 10. La longueur effective du capillaire de silice fondue (Photonetics, Marly le Roi, France) 50 cm et 70 cm de longueur totale.

La dérivation des acides aminés ou amines biogènes : 1 mL d'une solution de 2.1 10⁻⁴ M d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) isomère I dans l'acétone sont mélangés à 1 mL d'une solution aqueuse de 2 mg/mL d'acides aminés ou amines, et à 1 mL de tampon carbonate 200 mM. Après 7 heures de réaction, les fluorescéines thiocarbamyle acides aminés ou amines sont dilués afin d'obtenir une gamme étalon de 10⁻⁸ M à 10⁻¹⁰ M. Un mélange étalon d'acides aminés et amines permet d'obtenir la courbe de calibration. La dérivation des vins est réalisée en mélangeant 50 mL de vin à 50 mL de tampon carbonate et 50 mL de solution de FITC. Après 7 heures de réaction, l'échantillon est dilué 5 000 fois.

III — IDENTIFICATION DES IONS OU AMINES OU ACIDES AMINÉS

De façon générale les ions, amines ou acides aminés sont identifiés à partir des temps d'élutions de standards. En cas d'ambiguïté, un ajout d'analyte à l'échantillon permet l'identification de façon plus sûre.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons voulu montrer l'intérêt de l'électrophorèse capillaire dans l'analyse des vins avec des moyens de détection usuels tels que l'absorption UV inverse pour le dosage des acides organiques et inorganiques et des cations minéraux. Cette méthode de séparation a aussi été utilisée avec un mode de détection plus sophistiqué tel que la détection par fluorescence induite par laser pour l'étude des amines biogènes et des acides aminés. Les résultats obtenus montrent que cette technique est parfaitement adaptée pour l'analyse de ces composés dans le vin.

Du fait des très petites dimensions de la veine liquide dans le capillaire (quelques microlitres), les consommations de tampons électrolytes sont très faibles à la différence de techniques plus classiques telle la chromatographie liquide haute performance. Par ailleurs, le coût d'un capillaire reste très bas (quelques 50 F/m), pour une durée de vie relativement longue (600-1000 analyses). Enfin, la plupart des appareils du marché sont automatiques, ont de grandes capacités d'échantillons et offrent des autonomies d'utilisation de plusieurs dizaines d'heures. Ceci confirme bien que l'électrophorèse capillaire est une méthode de choix, pour l'analyse en routine de composés divers dans de très nombreux échantillons.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARELLANO M., ANDRIANARY J., DEDIEU F., COUDERC F. et PUIG Ph., 1997. Method development and validation for the simultaneous determination of organic and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, **765**, 321.
- BABA Y., MATSUURA T., WAKAMOTO K., MORITA Y., NISHITSU Y. et TSUHAKO M., 1992. Preparation of polyacrylamide-gel filled capillaries for ultrahigh resolution of polynucleotides by capillary gel electrophoresis. *Anal. Chem.*, **64**, 1221.
- CHENG Y.F. et DOVICH I.N.J., 1988. Laser based refractive index detection using the sheath flow cuvette. *Science*, **242**, 562.
- FORET F., FANALI S., NARDI A. et BOCEK P., 1990. Capillary zone electrophoresis of rare earth metals with indirect UV absorbency detection. *Electrophoresis*, **11**, 780.
- LEVI V., WEHR T., TALMADGE K. et ZHU M., 1993. Analysis of organic acids in wines by capillary electrophoresis and HPLC. *Am. Lab.*, **29**.
- LI K. et LI S.F.Y., 1994. Determination of anions in water samples by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 3889.
- OEFFNER P.J., VORNDRAN A.E., GRILL E., HUBER C. et BONN G.K., 1993. Capillary zone electrophoresis analysis of carbohydrates by direct and indirect UV detection. *Chromatographia*, **34**, 1004.
- PEYNAUD E., 1984. *Connaissance et travail du vin*. Ed Dunod-Bordas Paris, p 39.
- RIVIELLO J.M. et HARROLD M.P., 1994. Capillary electrophoresis of inorganic cations and low molecular-mass amines using a copper-based electrolyte with indirect UV detection. *J. Chromatogr.*, **652**, 385.
- SCHÖNEICH C., KWOK S.K., WILSON G.S., RABEL S.R., STOBAUGH J.F., WILLIAMS T.D., VANDER et VELDE D.G., 1993. Separation and analysis of peptides and proteins. *Anal. Chem.*, **65**, 67R.

SHAMSI S.A. et DANIELSON N.D., 1994. Naphthalene-sulfonates as electrolytes for capillary electrophoresis of inorganic anions, organic-acids and surfactants with indirect photometric detection. *Anal. Chem.*, **66**, 3757.

SHI Y.C. et FRITZ J.S., 1994. New electrolyte systems for

the determination of metal cations by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, **671**, 429.

TARTER J.G., 1987. *Ion Chromatography*, Marcel Dekker, Academic Press, New York.

Note reçue le 29 mai 1997