Connaissance Vigne Vin, 1988, **22,** N° 4, 299-303.

NOTE

DOSAGE DES ACIDES AMINÉS DES VINS ET DES MOÛTS PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE SUR COLONNE MACROBORE

G. FERRARI et Chantal HORY

E.N.I.T.A. Dijon, Laboratoire de Chimie-Technologie,
B.P. 48, 21802 Quétigny Cedex (France)

La méthode d'analyse des acides aminés du vin par chromatographie gaz-liquide mise au point en 1979 par LHUGUENOT reste intéressante, bien que la tendance actuelle soit l'utilisation de la chromatographie liquide haute performance (SANDERS, 1985; TRICARD, 1986). Cette technique également rapide est toutefois coûteuse.

Il nous a semblé opportun d'améliorer la méthode LHUGUENOT, en mettant à profit les développements récents en chromatographie gaz-liquide. En effet, cette analyse est longue (1 heure) et les chromatogrammes obtenus ne sont pas toujours excellents.

La technologie des colonnes a beaucoup progressé depuis 1979, notamment avec l'apparition des colonnes capillaires (utilisées dans ce cas par TORRES-ALEGRE, 1982; BERTRAND, 1982) puis des colonnes macrobores. Nous avons choisi ce dernier type, qui réalise un compromis entre la capacité des colonnes remplies et les performances des capillaires. De plus, elles peuvent être montées sur la plupart des chromatographes sans transformations.

Nous avons également reconsidéré la préparation des échantillons afin d'obtenir des chromatogrammes plus propres : les dérivations ont été améliorées grâce aux travaux de GOLAN (1979) qui préconise de substituer l'isopropanol (plus soluble et plus volatil) à l'isobutanol et à ceux de Mac KENZIE (1987) qui propose toute une série de modifications de détails.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. — RÉACTIFS

Les solvants (isopropanol, acétate d'éthyle, dichlorométhane, acétonitrile) sont déshydratés et distillés sous verre puis conservés sur tamis moléculaire. L'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) est fourni en ampoules scellées par Pierce. Les acides aminés (pureté $>$ 99 %) proviennent de chez Sigma. L'agent d'estérification est préparé par barbotage d'HCL gazeux sec dans l'isopropanol anhydre. Son titre (3N) est

vérifié par titration puis il est réparti en petits tubes à vis qui sont conservés au congélateur.

II. — MATÉRIEL

Les réactions se déroulent dans des flacons à fond conique de 1 ml (type «minivials») qui doivent être d'une propreté absolue; ils sont thermostatés sur des blocs chauffants à secs. L'évaporation est réalisée sous courant d'azote (déshydraté) sur un bloc chauffant «Thermevap» C.I.L.

III. — EXTRACTION

Le principe reste le même mais nous opérons préalablement une décoloration des vins et des moûts par du charbon végétal activé (PROLABO).

Pour cela, 50 ml de vin sont additionnés de 0,4 % de noir et placés sur agitateur magnétique pendant 30 minutes, puis filtrés deux fois sur filtres en papier (WHATMANN n° 5).

Ensuite, les protéines des moûts sont précipitées par addition de 4 ml d'acide trichloracétique (40 %) à 2 ml de jus de façon à diluer au 1/3. Le pH est alors voisin de 2. On récupère 1 ml de filtrat.

Pour les vins, l'acidification est obtenue par addition de 20 μl de HCL 6 N.

Après ajoût de 400 nM de monométhylysine (étalon d'extraction), les acides aminés libres sont fixés par passage sur des colonnes de résines échangeuses d'ions selon la technique de LHUGUENOT. Nous avons utilisé une résine DOWEX AG 50 W X8. Un lavage plus important (35 ml d'eau) est réalisé et les acides aminés sont élués par passage d'ammoniaque 4N. Cet éluat est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, presque à sec, puis repris (en deux fois) dans 1 ml d'acétonitrile, avec chaque fois sonication d'une minute. En effet, ce solvant convient bien pour les acides aminés et il ne dissout pas les composés phénoliques et les hydrocarbures, ce qui permet une purification supplémentaire. De plus, il forme un azéotrope avec l'eau et facilite donc la désydratation lors de l'évaporation à sec.

IV. — DÉRIVATION

Après addition de 300 nM de cycloleucine comme étalon interne pour le dosage, le résidu, déshydraté par deux fois 1 ml de dichlorométhane, est dérivé.

- estérification : ajoût de 400 microlitres d'isopropanol acidifié (3N) et chauffage de 2 heures à 80° C.
- acylation : après évaporation à sec, on dissous le dépôt dans 100 microlitres d'acétate d'éthyle et on ajoute 100 microlitres d'HFBA, puis on chauffe 20 minutes à 110° C.

Après refroidissement, on peut injecter dans le chromatographe 1 microlitre du liquide, éventuellement dilué au demi dans l'anhydride acétique.

V. — CHROMATOGRAPHIE

Nous avons utilisé une colonne macrobore type FSOT de 10 m de long et 0,53 mm de diamètre, recouverte de phase RSL 150 (1,2 micron d'épaisseur) (ALLTECH).

Le gaz vecteur est l'hélium, débarrassé de l'oxygène par un piège «oxysorb», avec un débit de 3 ml/min. L'injecteur, split less, pourvu d'un liner en verre pyrex, est porté à 220° C. Le détecteur FID est chauffé à 270° C et alimenté en air (250 ml/min) et hydrogène (25 ml/min). 1 μl d'échantillon est injecté.

La programmation de la température du four est la suivante : 80° C pendant 5 minutes, puis élévation de 6° C par minute jusqu'à 240° C température qui est maintenue 10 minutes.

Les pics sont quantifiés par un intégrateur SHIMADZU CR3A étalonné par l'injection répétée d'une solution standard d'acides aminés.

RÉSULTATS

La préparation des échantillons par cette technique reste longue, mais pour contourner cette difficulté, nous préparons les vins par séries de 6; les conditions chromatographiques retenues permettent une très bonne séparation de 21 acides aminés en 30 minutes. Cela permet donc le dosage de dix-huit échantillons par jour. On peut réduire ce temps d'analyse à 15 minutes mais l'identification devient alors risquée.

La figure 1 représente les chromatogrammes d'un mélange d'acides aminés de référence et d'un vin blanc de cépage Chardonnay.

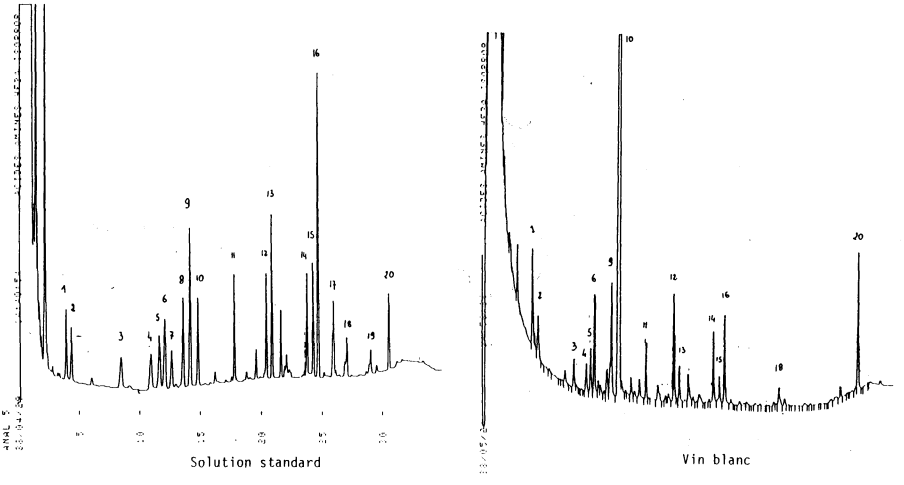


Fig. 1. — Chromatogrammes d'un mélange d'acides aminés et d'un vin blanc de cépage Chardonnay.

Ordre d'élution des acides aminés :
1 = ALA, 2 = GLY, 3 = VAL, 4 = THE, 5 = SER, 6 = LEU, 7 = ILEU, 8 = GABA, 9 = CLEU (IS), 10 = PRO, 11 = ASP, 12 = GLU, 13 = PHE, 14 = LYS, 15 = TYR, 16 MML, 17 = ARG, 18 = TRP, 19 = HIS, 20 = CYS.

Il faut noter que cette technique permet de doser l'acide 4-aminobutyrique (GABA), la citrulline et l'ornithine.

Nous avons choisi d'extraire deux fois chaque échantillon sur résine puis de les analyser trois fois chacun, ce qui fait 6 mesures par vin. On arrive ainsi à un coefficient de variation < à 5 % pour la plupart des acides aminés.

Cette technique a été utilisé pour suivre l'évolution des acides aminés d'un vin élevé sur lie en fût de chêne, méthode traditionnelle en Bourgogne. Les résultats concernant quelques acides aminés sont reportés sur l'histogramme de la figure n° 2. On peut noter que certains acides aminés restent stables alors que d'autres augmentent : lysine, leucine, glycine, valine.

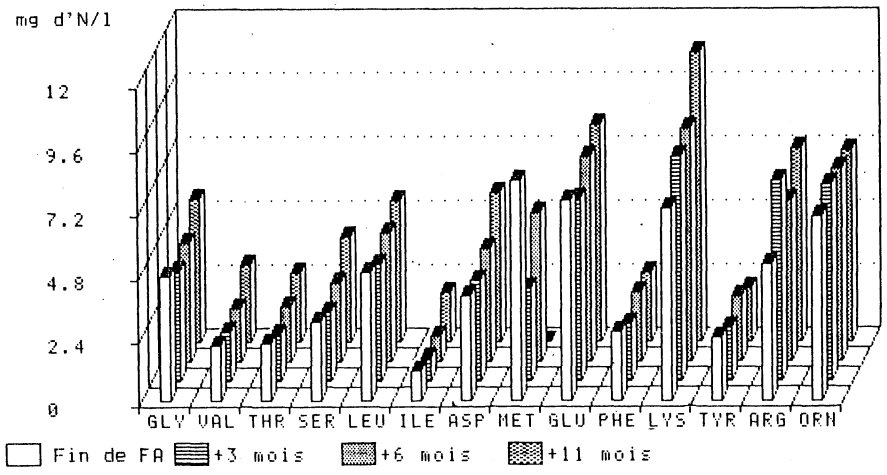


Fig. 2. — Évolution de la composition en acides aminés d'un vin blanc de Bourgogne élevé sur lie.

CONCLUSION

Les modifications apportées à la technique de LHUGUENOT réactualisent son intérêt, notamment pour les laboratoires déjà équipés en appareil de chromatographie en phase gazeuse. D'autres améliorations sont possibles et souhaitables et nous travaillons actuellement à simplifier le protocole d'extraction des acides aminés. En effet, il existe maintenant des minicartouches de silice pour l'extraction liquide-solide qui semblent convenir pour ce travail, et ce en un temps très court.

Note reçue le 9 août 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERTRAND A., MEDINA B., et CHEVALLIER J.P., 1982. Évolution des acides aminés des vins rouges en fonction de la durée de macération. *Connaissance Vigne Vin,* **16,** N° 2, 110-123.

GOLAN A., et WOLFE F.M., 1979. Gas chromatographic analysis of protein amino acids N-heptafluorobutyric-isopropyl esters. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.,* **12,** N° 3, 123-127.

LHUGUENOT J.C., et UDE L., 1979. Analyse des acides aminés dans les vins et dans les moûts de raisins en cours de fermentation alcoolique par chromatographie gas-liquide. *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 775, 275-286.

Mc KENZIE S.L., 1987. Gas chromatographic analysis of amino acids as N-heptafluorobutyric-isobutyric esters. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* **70,** N° 1, 151-160.

SANDERS E.M., OUGH C.J., 1985. Détermination of free aminoacids in wine by H.P.L.C., *Am. J. Enol. Vitic.,* **36,** N° 1, 43-46.

TORRES-ALEGRE J.M., 1982. Formation des acides gras et autres produits secondaires au cours de la vinification. *Thèse Docteur-Ingénieur,* Université de Bordeaux II.

TRICARD C. et SALAGOÏTY Marie-Hélène, 1986. Séparation des acides aminés en C.H.L.P. après dérivation par le FMOC. *Chimie Magazine,* N° 44, 93-94.