

RÉSOLUTION OIV-OENO 603-2018

MONOGRAPHIE SUR LES LEVURES INACTIVÉES À TENEUR GARANTIE EN GLUTATHION

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

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,

CONSIDÉRANT les deux résolutions OIV-OENO 532-2017 "Traitement des moûts à l'aide de levures inactivées à teneur garantie en glutathion" et OIV-OENO 533-2017 "Traitement des vins à l'aide de levures inactivées à teneur garantie en glutathion"

DÉCIDE d'adopter et d'intégrer dans le chapitre 1 du Codex œnologique international la monographie suivante :

LES LEVURES INACTIVÉES À TENEUR GARANTIE EN GLUTATHION

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Ces levures sèches inactivées (LSI) à teneur garantie en glutathion sont caractérisées par une teneur en glutathion réduit supérieure à celle contenue dans les levures inactivées standard,

Elles sont utilisées pour limiter les phénomènes d'oxydation dans les moûts et les vins. La présence de glutathion réduit (GSH) peut être accompagnée de celles de ses précurseurs, la cystéine et, notamment, la gamma-glutamyl-cystéine.

Comme les levures sèches inactivées classiques, elles apportent également des nutriments pour les levures au début et au cours de la fermentation alcoolique. Elles peuvent aider à réduire le niveau en Ochratoxine A, aux étapes des opérations d'élevage et de clarification des vins^[1] (résolution OENO 459-2013).

Elles sont issues de biomasses de *Saccharomyces spp* et/ou de non *Saccharomyces* dont la production est dirigée de façon à augmenter la production naturelle de glutathion sous forme réduite (GSH). Elles sont donc issues de cultures pures sans aucun ajout ultérieur de glutathion ou de cystéine et de gamma-glutamyl-cystéine dans le produit final, ce qui est attesté par un rapport gamma-glutamyl-cystéine/GSH supérieur à 20 %.

Elles sont inactivées par la chaleur et/ou par une modification du pH. Elles peuvent

avoir subi un début d'autolyse naturelle sous l'action des enzymes endogènes. Il n'y a aucun ajout d'antibiotique dans le procédé ni de composés autres que ceux nécessaires à la croissance de la levure.

Lorsque les levures inactivées proviennent de levures génétiquement modifiées, celles-ci doivent avoir été soumises à l'autorisation préalable des autorités compétentes.

2. ÉTIQUETAGE

Doivent figurer sur l'étiquette:

- Le nom du genre et de l'espèce des levures inactivées à teneur garantie en glutathion
- La teneur minimale, exprimée en mg/g de levures sèches inactivées (LSI), en glutathion réduit
- La teneur maximale, exprimée en mg/g de levures sèches inactivées (LSI), en cystéine
- La teneur maximale, exprimée en mg/g de levures sèches inactivées (LSI), en gamma-glutamyl-cystéine.
- La teneur en azote organique
- Les additifs éventuels
- Le mode d'emploi
- Le numéro du lot ainsi que la date limite d'utilisation et les conditions de conservation, notamment de température, d'humidité et d'aération.
- L'indication que les levures inactivées proviennent de levures obtenues par modifications génétiques ainsi que le caractère modifié, si cela est le cas.

3. CARACTÈRES

Elles se présentent le plus souvent sous forme de granules, poudre ou flocons de couleur jaune clair à ocre jaune avec une odeur caractéristique de levure. Les levures inactivées à teneur garantie en GSH sont en partie solubles dans l'eau, la partie insoluble étant supérieure ou égale à 60% m/m de la matière sèche.

4. LIMITES ET MÉTHODES D'ESSAIS

4.1. Teneur en glutathion oxydé (GSSG)

Les teneurs en glutathion sous forme oxydée en disulfure de glutathion (GSSG), la seule identifiée en l'état de nos connaissances, sont mesurées par la méthode CLHP décrite en annexe 1.

4.1.1. Préparation de la solution pour essais

Peser précisément 2 g de levures sèches inactivées et placer les dans un tube à centrifuger de 20 ml, ajouter 1 ml de billes de verre de 425 à 600 microns et 4 ml de solution tampon phosphate pH 7,5.

Passer au vortex pendant 20 min à 4°C puis centrifuger à 4°C pendant 20 min à 12000 g minimum.

Le surnageant représente la solution pour essais à garder à 4°C à l'abri de la lumière pendant 4h maximum avant le dosage.

Le rapport entre glutathion réduit et le glutathion oxydé devrait être supérieur à 3.

4.2. Teneurs en glutathion réduit (GSH), en cystéine et gamma-glutamyl-cystéine

Les teneurs en glutathion réduit, en cystéine et gamma-glutamyl-cystéine sont mesurées par la méthode CLHP après dérivation décrite en annexe 4

- La teneur en glutathion réduit doit être supérieur à 1 %, soit 10 mg/g de LSI
- La teneur en cystéine endogène doit être inférieure à 0,3 % maximum, soit 3 mg/g de LSI
- La teneur en gamma-glutamyl-cystéine doit être inférieure à 1 %, soit 10 mg/g de LSI

4.3. Teneur en azote

4.3.1. La teneur en azote total, exprimée en élément N, est inférieure à 10 % de la matière sèche, selon la méthode d'analyse décrite au Chapitre II du *Codex Œnologique International*, soit N_t

4.3.2. La teneur en azote ammoniacal, exprimée en élément N, doit être inférieure à

0,5% de la matière sèche, elle est déterminée selon la méthode d'analyse décrite en **annexe 2**, soit Na

4.3.3. La teneur en azote organique est obtenue par la différence entre la teneur en azote total et la teneur en azote ammoniacal. :

Azote organique = $NT - Na$

4.3.4. La teneur en acides aminés libres et solubles et en petits peptides doit être inférieure à 10% de matière sèche en équivalent glycine, selon la méthode DNFB décrite en annexe 3, soit 1,9 % de la matière sèche exprimée en élément N

4.4. Humidité

Elle est mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant (environ 3 heures). La teneur maximale doit être inférieure à 7 %.

4.5. Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de matière sèche.

4.6. Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.7. Arsenic

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. La teneur doit être inférieure 3 mg/kg de matière sèche.

4.8. Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.9. Levures revivifiables

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Œnologique International*. Le nombre doit être inférieur ou égal à 102 UFC/g de matière sèche.

4.10. Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex*

Codex Alimentarius International. Le nombre doit être inférieur à 10³ UFC/g de matière sèche.

4.11. Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Alimentarius International*. Le nombre doit être inférieur à 10³ UFC/g de matière sèche.

4.12. Bactéries acétiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Alimentarius International*. Le nombre doit être inférieur à 10³ UFC/g de matière sèche.

4.13. Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Alimentarius International*. L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g de matière sèche.

4.14. Escherichia coli

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Alimentarius International*. L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g de matière sèche.

4.15. Staphylocoques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Alimentarius International*.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g de matière sèche.

4.16. Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du *Codex Alimentarius International*. Le nombre doit être inférieur à 10² UFC/g de matière sèche.

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION

Ne pas conserver en conditionnement ouvert. Les levures inactivées à teneur garantie en glutathion doivent toujours être conservées à l'abri de l'air dans des sachets scellés. Stocker dans un endroit frais et sec. Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant. Un stockage dans des conditions non appropriées peut réduire la teneur du produit en glutathion réduit (GSH).

Annexe 1

Dosage du glutathion réduit et oxydé CLHP

Ce dosage est effectué selon la méthode de détermination du glutathion dans des préparations pharmaceutiques selon Soliman et al. (2014).

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage du glutathion réduit et du glutathion oxydé ou disulfure de glutathion (GSSG) dans une gamme de concentration de 0 à 100 mg/L de préparation pour l'analyse.

2. Principe

La méthode utilisée procède par chromatographie liquide à haute performance selon le principe de phases inverses (colonne C18) avec une détection par spectrophotométrie utilisant un appareil à barrettes de diodes entre 200 et 400 nm.

3. Produits et réactifs

3.1. Liste des produits

3.1.1. Glutathion (GSH, > 98 %),

3.1.2. Méthanol (pureté pour CLHP)

3.1.3. Acide formique (pureté > 98 %)

3.1.4. Eau ultrapure de résistivité >18 M Ω .cm à une température de 25 °C

3.2. Phase mobile

La phase mobile est constituée d'eau ultrapure (3.1.4) contenant 0,1 % du mélange

acide formique (3.1.3) et de méthanol (3.1.2) dans les proportions de 90 : 10, v/v.

4. Matériels

- 4.1. Appareil de chromatographie en phase liquide haute performance.
- 4.2. Spectrophotomètre à barrettes de diodes
- 4.3. Appareil d'acquisition des données
- 4.4. Colonne de type octadécyle de dimensions 150 mm x 2 mm avec un diamètre de phase de 3 µm (à titre d'exemple).
- 4.5. Injecteur à boucle de 230 µL
- 4.6. Système de dégazage des solvants (ultrasons)
- 4.7. Système de filtration des échantillons sur membrane de diamètre de pores de 0,45 µm

5. Préparation des échantillons

- 5.1. L'échantillon contenant le glutathion à doser est préparé par dilution de la solution pour essais (point 4.1.1 de la monographie) dans la phase mobile (3.2) afin d'obtenir une concentration finale de l'ordre de 20 mg/L
- 5.2. Les échantillons sont filtrés sur membrane (4.7) avant injection.

6. Mode opératoire

L'analyse s'effectue à la température ambiante, selon le mode isocratique avec un débit de phase mobile de 0,5 mL/min.

La détection s'effectue selon le mode "scan" de 200 à 400 nm.

7. Résultats

Dans ces conditions analytiques, le glutathion réduit (GSH) est bien séparé du glutathion oxydé (GSSG). Cette méthode permet par conséquent de doser les deux formes du glutathion

Dans ces conditions analytiques, le temps de rétention du glutathion est de 7,5 min, celui du glutathion oxydé est de 9,5 min.

8. Caractéristiques de la méthode

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.

La régression linéaire et le coefficient de corrélation sont calculés selon la méthode des moindres carrés.

Linéarité

La gamme de linéarité est de 0 - 100 mg/L, le coefficient de corrélation $R = 0,9998$.

Précision

La précision de la méthode a été évaluée à partir de 3 analyses de glutathion à 1,0, 50,0, et 100,0 mg/L d'une part en une seule journée et d'autre part en 3 jours différents.

Tableau 1 Caractéristiques de la méthode de dosage du glutathion réduit à partir des taux de récupération.

Concentration GSH mg/L	Précision journalière		Précision sur 3 jours	
	% récupération, SD	CV %	% récupération, SD	CV %
1	99,88 ± 0,68	0,68	99,76 ± 1,89	1,89
50	100,04 ± 0,39	0,39	100,09 ± 0,73	0,73
100	99,93 ± 0,57	0,57	99,85 ± 0,86	0,86

Domaine d'application

Selon les déterminations effectuées, la méthode est applicable pour des concentrations de 0 à 100 mg/L

Les limites de détection et de quantification du glutathion établies selon les lignes directrices de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (ICH), (3,3 et 10 fois la déviation standard du blanc, pour 7 analyses, sur la pente de la droite de calibration, sont $LD = 20 \mu\text{g/L}$ et $LQ = 68 \mu\text{g/L}$.

9. Bibliographie

1. Soliman R.M, Hadad G.M, Abdel Salam R.A., Mesbah M.K., (2014) Quantitative determination of glutathione in presence of its degradant in a pharmaceutical preparation using HPLC-DAD and identification by LC-ESI-MS. J. Liquid Chromatography and related technologies 37:548-559.

Annexe 2

Dosage de l'azote ammoniacal

1. Réactifs

1.1. Chlorure de potassium (KCl 0,5 M)

Dissoudre 18,64 g de KCl dans 500 mL d'eau déminéralisée pure

1.2. Hydroxyde de sodium à 30 %

Placer 30 g d'hydroxyde de sodium dans une fiole de 100 mL ajouter 70 mL d'eau déminéralisée pure, dissoudre par agitation, compléter à 100 mL,

1.3. Acide borique à 4 % (R)

Voir R partie II du codex œnologique international,

1.4. Acide chlorhydrique 0,1 M pour titration (solution prête à l'emploi du commerce),

1.5. Indicateur mixte au rouge de méthyle et bleu de méthylène voir R partie II du codex œnologique international,

2. Matériel

2.1. Verrerie de laboratoire,

2.2. Appareil à entraînement par la vapeur d'eau décrit au Chapitre II du Codex Œnologique International pour le dosage de l'azote total

3. Dosage

3.1. Placer 1 g de matière sèche de levures inactivées dans 100 ml de KCL 0,5 M

(1.1), agiter pendant 20 à 30 min,

3.2. Introduire les 100 ml dans l'appareil à entraînement par la vapeur d'eau (2.2.), 50 ml d'hydroxyde de sodium à 30 % (R),

3.3. Distiller en recueillant 250 ml dans une fiole conique contenant 5 ml d'acide borique à 4 % (1.3), 10 ml d'eau et 2 à 3 gouttes d'indicateur mixte au rouge de méthyle et bleu de méthylène (1.5), titrer le distillat par l'acide chlorhydrique 0,1 M (1.4) jusqu'au virage au violet rose de l'indicateur.

1 ml de solution d'acide chlorhydrique correspond à 1,4 mg d'azote N.

Soit n le nombre de ml versé :

100 g de levures sèches inactivées contiennent 0,14 n g d'azote ammoniacal exprimé en élément N. soit N_a

Annexe 3

Méthode de l'azote aminé

1. Introduction

Cette méthode permet de doser rapidement l'azote aminé dans une solution biologique par rapport à une gamme étalon réalisée avec une solution de glycine.

2. Domaine d'application

Produits œnologiques d'origine végétale ou animale

3. Définition

Le dinitrofluorobenzène ou DNFB réagit avec les fonctions NH_2 libres contenues dans les acides aminés pour donner un composé de couleur jaune vif dosé par colorimétrie à 420 nm. La réaction s'effectue à un $\text{pH} > 9,3$.

4. Réactifs et produits

Réactifs :

4.1. Borax ou Tétraborate de sodium,

4.2. Dinitrofluorobenzène, attention aux dangers lors de la manipulation du DNFB

- 4.3. Acide chlorhydrique 10 M,
- 4.4. Glycine, pureté $\geq 98\%$, □
- 4.5. Éthanol 95 % vol. □

5. Appareillage

- 5.1. Tubes à hémolyse,
- 5.2. Micropipettes,
- 5.3. Spectrophotomètre pour mesures dans le visible,
- 5.4. Bain d'eau à 60 °C. □

6. Echantillonnage

- 6.1. Préparer une solution de tétraborate de sodium à 5% dans de l'eau pure, □
- 6.2. Préparer une solution de DNFB : introduire 130 µl de DNFB dans 10 ml d'éthanol à 95 % vol., □
- 6.3. Préparer une solution d'acide chlorhydrique 2M, □
- 6.4. Réaliser une gamme étalon à partir d'une solution mère de glycine à 2 g/L (M=75,07 g) par ex 0,50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L, □
- 6.5. Préparer une suspension à 2 g/L du produit à doser, centrifuger après 30 min et récupérer le surnageant.

7. Mode opératoire

- Dans un tube à hémolyse introduire :

380 µl de Borax à 5% (6.1),
□ 20 µl de l'échantillon à doser (6.5),
20 µl de solution au DNFB (6.2), □
Procéder à l'identique pour la gamme de glycine,

- Agiter et placer au bain d'eau à 60 °C pendant 30 min (5.4),
- Ajouter 3 ml de HCl 2M (6.3),
- Agiter et lire l'absorbance spécifique à 420 nm pour l'échantillon (5.3),

- Réaliser une droite étalon avec la gamme de Glycine (6.4). □

8. Résultats

Reporter la valeur de l'absorbance à 420 nm de l'échantillon sur la droite étalon. Les résultats sont exprimés en g de Glycine /L.

Annexe 4

Dosage du glutathion réduit, de la cystéine et gamma-glutamyl-cystéine par CLHP après dérivation

Préambule

Le principe est de doser par CLHP/CLUP-UV sur colonne en phase inverse des acides aminés et des peptides thiolés après dérivation de cette fonction. Cette méthode est adaptée à des matrices complexes du type levures et dérivés de levures.

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage du glutathion réduit (GSH), de la cystéine (Cys) et de la gamma-glutamyl-cystéine (GluCys) dans une gamme de concentration allant de :

- De 2 à 24 mg/L pour les composés GSH et GluCys,
- De 0,5 à 6 mg/L pour la Cys.

2. Principe

La méthode utilisée procède par chromatographie liquide à haute performance selon le principe de phase inverse (colonne C18) avec une détection par spectrophotométrie à 320nm.

3. Produits et réactifs

3.1. Produits

- 3.1.1. GSH : Glutathion, n° CAS 70-18-8 (pureté > 98 %)
- 3.1.2. Cys.HCl.H₂O : Chlorhydrate de L-Cystéine monohydratée, n° CAS 7048-04-6 (pureté >98 %)
- 3.1.3. GluCys : γ -L-Glutamyl-L-cystéine, n° CAS 636-58-8 (pureté > 80 %)
- 3.1.4. Dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄.H₂O), pur
- 3.1.5. Acétate de sodium anhydre, pur
- 3.1.6. Acide acétique 17,4 M, pur
- 3.1.7. Méthanol (pureté pour CLHP)
- 3.1.8. Acide phosphorique concentré (pureté > 98 %)
- 3.1.9. Eau ultrapure de résistivité >18 M Ω .cm à une température de 25 °C.
- 3.1.10. Acétonitrile, pure
- 3.1.11. 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine) (DNTP), n°CAS [2127-10-8](#) (pureté > 96%)
- 3.1.12. Solution concentrée d'acide trichloracétique (25-30 %)

3.2. Tampon acétate (utilisé pour la dérivation)

Peser 8.1g d'acétate de sodium (3.1.5), les dissoudre dans environ 100 mL d'eau ultra pure (3.1.9).

Ajuster le pH à 6,3 avec de l'acide acétique (3.1.6) (environ 100 à 200 μ l).

Compléter à 1L avec de l'eau ultra pure (3.1.9).

3.3. Réactif 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine) (DNTP) (à préparer extemporanément)

Peser 30 mg de DNTP (3.1.11), les dissoudre dans 10 mL d'acétonitrile (3.1.10).

3.4. Acide trichloracétique à 5,7 %

Dissoudre 19 g d'acide trichloracétique à 30 % (3.1.12) dans 100 mL d'eau ultra pure (3.1.9).

3.5. Phase mobile

Eluant A : Peser 3,4g de NaH₂PO₄.H₂O (3.1.4), les dissoudre dans 898g d'eau ultra pure (3.1.9), ajouter 79g de méthanol (3.1.7), ajuster le pH de 4,45 à 2,5 par addition d'acide phosphorique concentré (3.1.8) (environ 0,8 - 1ml).

Eluant B : Méthanol (3.1.7).

4. Matériels

- 4.1. Appareil de chromatographie en phase liquide haute performance
- 4.2. Spectrophotomètre avec détection à 320 nm
- 4.3. Appareil d'acquisition des données
- 4.4. Colonne de type octadécyle de dimensions 250 mm x 4.6 mm avec un diamètre de phase de 5 µm (à titre d'exemple, RP Supelcosil ABZ+Plus ; Water XTerra RP18 ou équivalent)
- 4.5. Injecteur à boucle
- 4.6. Système de dégazage des solvants (ultrasons)
- 4.7. Système de filtration des échantillons sur membrane de diamètre de pore de 0,45 µm
- 4.8. Agitateur magnétique
- 4.9. Centrifugeuse
- 4.10. pH mètre
- 4.11. Verrerie courante de laboratoire

5. Préparation des échantillons

5.1. Préparation des étalons

5.1.1. Solution de GSH à ~400 mg/L

- Dans une fiole de 200 ml, dissoudre ~80 mg de GSH (3.1.1) pesés **exactement**, et compléter à 200 ml par de l'eau ultra pure (3.1.9).

5.1.2. Solution de GluCys à ~400 mg/L

- Dans une fiole de 50 ml, dissoudre ~20 mg de GluCys (3.1.3) pesés **exactement**, et compléter à 50 ml par de l'eau ultra pure (3.1.9).

5.1.3. Solution de Cys.HCl.H₂O à ~100 mg/L

- Dans une fiole de 100 ml, dissoudre ~130 mg de Cys.HCl.H₂O (3.1.2) pesés **exactement**, et compléter à 100 ml par de d'eau ultra pure (3.1.9), diluer ensuite au 1/10e avec de l'eau ultra pure (3.1.9).

5.2. Préparation des échantillons

La prise d'essai (PE) de l'échantillon doit être adaptée pour que la concentration soit comprise dans la gamme d'étalonnage, c'est-à-dire entre 2 et 24 mg/L de GSH. Pour une levure sèche inactivée (LSI) à teneur garantie en GSH, effectuer au préalable une extraction selon le protocole suivant :

- Peser ~1g de LSI **exactement**, ajouter 17,5mL d'acide trichloracétique à 5,7 % (3.4).
- Agiter pendant 20 min à température ambiante (4.8)
- Ajuster à 50 mL (=V) avec de l'eau ultra pure (3.1.9).
- Centrifuger 10 min à 5500 tr/min. (4.9).

6. Dérivatisation

- A effectuer dans des tubes à essai à partir des préparations 5.1 selon le tableau suivant.
- Agiter les tubes par retournement.

La réaction est complète en 5 minutes. Les différentes solutions sont analysées par CLHP après filtration (4.7).

						En double
	Standard 1 GSH et GluCys : 2mg/L Cys 0.5 mg/L	Standard 2 GSH et GluCys : 4mg/L Cys 1 mg/L	Standard 3 GSH et GluCys : 8mg/L Cys 2 mg/L	Standard 4 GSH et GluCys : 16mg/L Cys 4 mg/L	Standard 5 GSH et GluCys : 24 mg/L Cys 12 mg/L	Essai
Tampon acétate (ml)	8.85	8.7	8.4	7.8	7.2	8

Solution étalon (µl)	GSH (400 mg/L)	50	100	200	400	600	
	Cys (100 mg/L)	50	100	200	400	600	
	GluCys (400 mg/L)	50	100	200	400	600	
Echantillon (µl)							1000
DNTP (µl)	1000						

Attention : Penser à adapter la prise d'essai en fonction de la coloration. Vérifier que les essais soient bien dans la gamme.

7. Conditions chromatographiques

Température de la colonne : 30 °C Durée de l'analyse : 34 min

Température échantillon : 5 °C Délai d'équilibration en fin d'analyse : 10 min

Débit phase mobile : 1 ml/min

Volume d'injection : 5 µl Rinçage : ea

Pression : 140-175-103 hPa (environ 2000-2500 psi) Stockage : eau / Méthanol 80:20 v/v

Détection : 320 nm

Temps après injection (min)	% éluant A	% éluant B
	100	0
1	100	0
23	40	60
28	0	100

32	0	100
34	100	0

8. Droites d'étalonnage

Pour chaque analyte, établir les droites de calibration $C \text{ (mg/L)} = f[A]$ en tenant compte :

- Des concentrations en mg/L pour la Cys, le GSH et la GluCys
- Du facteur de dilution,
- Des aires obtenues.

Attention : Pour la Cys, **tenir compte de l'HCl** : $PE \text{ (g/L)} * MCys \text{ pure (121,16 g/mol)} / MCys, HCl.H_2O \text{ (175,63 g/mol)}$

Calculs des concentrations :

Ramenées à la matière sèche (MS) :

$$g/100 \text{ MS} = \frac{\text{aire}}{\text{pente}} \times \frac{V(=50 \text{ ml})}{PE \text{ (g)}} \times \frac{1}{10 \times MS}$$

Ou sur produit tel que :

$$g/100g = \frac{\text{aire}}{\text{pente}} \times \frac{V(=50 \text{ ml})}{PE \text{ (g)}} \times \frac{1}{1000}$$

9. Bibliographie

1. Rahman et al ; Nature Protocols 1, 3159 - 3165 (2007)
2. Katrusiac et al., Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and

glutathione in plasma and cell extracts. Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 758-2; (2001): 207-212

3. Raju N.Appala et al., A Simple HPLC-UV Method for the Determination of Glutathione in PC- 12 Cells, Scientifica, Volume 2016 (2016).

^[1] Code des bonnes pratiques vitivinicoles en vue de limiter au maximum la présence d'OTA dans les produits issus de la vigne