

Evaluation d'une méthode CLHP adaptée au dosage des acides aminés du vin

par

E. SOUFLEROS¹⁾ et A. BERTRAND²⁾

¹⁾ Faculté de Technologie Alimentaire et de Nutrition, Institut d'Enseignement Technologique (T.E.I.) Alexandrio de Thessalonique, Thessalonique, Grèce

²⁾ Faculté d'Oenologie, Université de Bordeaux 2, Talence, France

R é s u m é : Afin de rechercher l'origine des amines biogènes, nous avons dosé les acides aminés d'un grand nombre d'échantillons de vin. Une méthode de CLHP utilisant la détection par fluorimétrie des dérivés *o*-phtaldialdéhyde (OPA) a été adaptée pour séparer spécifiquement les acides aminés, précurseurs des amines biogènes. La séparation a été effectuée à l'aide de deux colonnes en série de type phase inverse C18 Lichrospher 100 RP18. Cette méthode permet l'analyse de 16 échantillons par 24 h à l'aide d'un passeur/préparateur automatique. Son évaluation montre qu'elle présente une linéarité satisfaisante et que sa répétabilité est excellente (CV=2,29 à 7,25 %). La variabilité intralaboratoire montre qu'il existe peu d'écart parmi les analyses effectuées dans les différents jours.

Evaluation of an HPLC method adapted for the determination of amino acids in wine

S u m m a r y : To investigate the origin of biogenic amines, we have determined the amino acid content of a large number of wine samples. An HPLC method with fluorescence detection of OPA derivatives was adapted to separate specifically the amino acids which are the precursors of biogenic amines. The separation was effected by means of two columns of Lichrosphere 100 RP18. This method allows the analysis of 16 samples per 24 h, by means of an autosampler, and shows a satisfactory linearity and an excellent repeatability (CV= 2.29 to 7.25 %). The intralaboratory variability was judged to be satisfactory; the deviation between the results, obtained on different days of the analysis of the same sample, was small.

K e y w o r d s : amino acids, biogenic amines, HPLC, fluorescence, wine, method evaluation.

Introduction

Les amines biogènes du vin présentent un intérêt scientifique, à cause de leur toxicité potentielle. Elles peuvent être responsables d'effets physiologiques indésirables chez l'homme, spécialement en présence de l'alcool et de l'éthanal (MAYNARD et SCHENKER 1962; LEHTONEN *et al.* 1992; BAUZA *et al.* 1995; SOUFLEROS *et al.* 1995).

De faibles teneurs existent déjà naturellement dans le moût (LAFON-LAFOURCADE 1975; OUGH et DAUDT 1981; BUTEAU *et al.* 1984). Des quantités supplémentaires peuvent se former dans les vins par décarboxylation enzymatique des acides aminés correspondants. Cette activité peut venir de l'intervention de certaines souches de bactéries lactiques (PUPUTI and SUOMALAINEN 1969; MAYER et PAUSE 1973, 1978; RADLER 1975; BAUZA *et al.* 1995) ou/et de certaines souches de levures (LAFON-LAFOURCADE 1975; BUTEAU *et al.* 1984; POGORZELSKI 1992).

Les conditions édaphoclimatologiques auxquelles la vigne est soumise ainsi que les mécanismes biochimiques pendant et après les fermentations du moût influencent leur concentration finale dans les vins (ETIÉVANT *et al.* 1988; HUANG et OUGH 1989).

Les acides aminés constituent 30 à 40 % de l'azote total du vin (RIZZON 1985) et ils présentent un intérêt important puisque les levures les utilisent et ils sont indispensables pour leur besoin en azote. D'autre part, certains acides

aminés tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, pourraient intervenir sur la qualité des vins en raison des alcools dont ils sont, au moins en partie, les précurseurs.

Les acides aminés libres peuvent être dosés de manière simple après transformation avant l'analyse chromatographique (dérivés précolonne). Les réactifs utilisés dans ce but sont le phénylisothiocyanate (PITC) pour obtenir des "PITC-acides aminés" ou l'*o*-phtaldialdéhyde (OPA) pour obtenir des "OPA-acides aminés" (MARCÉ *et al.* 1989; CALULL *et al.* 1991). Afin de doser les acides aminés secondaires, hydroxyproline et proline, qui ne réagissent pas avec l'OPA, il est nécessaire d'utiliser simultanément avec l'OPA un autre réactif, le 9-fluorenylméthylchloroformate (FMOC) (SANDERS et OUGH 1985). Cependant, YOKOTSUKA *et al.* (1989) proposent le dosage de la proline et de l'hydroxyproline en même temps que les autres acides aminés à l'aide de l'OPA, après une oxydation de l'échantillon du vin avec H₂O₂. D'autre part, VASCONCELOS et CHAVES DAS NEVES (1990) utilisent la chromatographie en phase gazeuse afin de doser les acides aminés libres après leur transformation en esters d'isopropyl *N*-heptafluorobutyryl, tandis que DRDÁK *et al.* (1992) dosent ces acides à l'aide de la chromatographie sur colonne d'échange d'ions.

Nous avons dosé les acides aminés du vin à l'aide d'une méthode CLHP utilisant la technique de dérivation précolonne à l'OPA. Pour rendre cette technique plus efficace, nous avons procédé à l'automatisation et à l'étude de di-

vers facteurs afin d'augmenter la durée de vie de la colonne chromatographique. Nous avons également étudié d'autres paramètres du mode opératoire de façon à rendre meilleure la sensibilité et la répétabilité du procédé (longueur de la colonne, dégazage de solvant à l'hélium, débit des éluants etc.).

La validation d'une méthode d'analyse basée sur plusieurs normes (ANONYME 1986, 1987 et 1993 a), directives communautaires et publications scientifiques doit comprendre les trois points suivants (PEREIRA MONTEIRO et BERTRAND 1994): la description de la méthode, l'évaluation "interne" (intralaboratoire) et l'évaluation "externe" (interlaboratoires), qui conduit à la détermination de la reproductibilité et de la répétabilité de la méthode. Nous avons étudié les deux premiers points qui concernent l'évaluation intralaboratoire.

Description de la méthode

Objet domaine d'application et principe de la méthode: Cette méthode de dosage a pour but la meilleure séparation des acides aminés, précurseurs des certaines amines biogènes et la détermination automatisée d'un grand nombre d'acides aminés des vins. Nous avons pu en doser 21.

En milieu alcalin (pH 10,4), des dérivés fluorescents sont formés à partir de l'*o*-phthaldialdéhyde (OPA), du 2-mercaptoéthanol et du groupe amine primaire de l'acide aminé. Les dérivés sont séparés par CLHP et détectés par spectrofluorimétrie.

Réactifs: Acétonitrile lichrosolv et méthanol lichrosolv (Merck), l'OPA, 2-mercaptoéthanol (Fluka), acide borique, hydroxyde de potasse, acétate de sodium trihydraté et acide *o*-phosphorique (Prolabo), triéthylamine (TEA) et tétrahydrofurane (THF) (Fluka), acide acétique (Prolabo).

Réactif de dérivation (solution de l'OPA): 50 mg de cristaux d'OPA et 2,5 ml de 2-mercaptoéthanol (ME) sont introduits dans une fiole jaugée de 50 ml, complétée ensuite avec du méthanol. On conserve à 4 °C sous N₂, à l'abri de la lumière. On laisse reposer 24 h avant l'emploi. Dans les conditions normales d'utilisation, on a vérifié que la solution est stable pendant 7 d.

Solution tampon: Le tampon borate est fait d'un mélange de 6,194 g d'acide borique (H₃BO₃) et de 6,524 g de KOH, ajusté à pH 10,4 avec de l'acide *o*-phosphorique et amené à 200 ml avec de l'eau milli-Q (distillée et microfiltrée de 18,2 MΩ de résistivité). Dans les conditions normales d'utilisation, la solution conservée à 4 °C est stable pendant plusieurs mois.

Eluant A: Il est fait d'un mélange de 1,36 g d'acétate de sodium trihydraté, 500 ml d'eau milli-Q, 90 µl de TEA, 1,5 ml de THF. Le pH est ajusté à 7,2 avant l'addition de la THF, à l'aide de l'acide acétique 1-2 %. L'éluant est filtré sur membrane de 0,45 µm.

Eluant B: Il est fait d'un mélange de 1,36 g d'acétate de sodium trihydraté, 100 ml d'eau milli-Q, 200 ml d'acétonitrile et 200 ml du méthanol. Le pH est ajusté à 7,2 après l'addition de l'eau milli-Q. L'éluant est filtré sur membrane de porosité de 0,45 µm.

Solution de référence: Elle est constituée de 21 acides aminés à des concentrations voisines de celles trouvées dans le vin. La dilution a été faite avec de l'eau milli-Q, légèrement acidifiée avec l'HCl (2-3 gouttes). La concentration des acides aminés additionnés figure au Tab. 1.

Solutions d'étalonnage: Deux séries de solutions d'étalonnage sont préparées par dilution de la solution mère en solution hydro-alcoolique à 10 % vol. Chaque série contenait 6 concentrations. Nous avons ainsi obtenu, à titre d'exemple, des concentrations en histidine de 3,8 à 121,4 mg·l⁻¹ dans la première série et de 1,52 à 61,0 mg·l⁻¹ dans la deuxième.

Préparation des échantillons: Les vins sont répartis dans des flacons en verre du passeur (vials), hermétiquement fermés.

Appareillage: Nous avons utilisé un appareil de CLHP Hewlett-Packard, modèle HP 1050, muni d'un système de prélèvement automatique de 21 échantillons et d'un système de pompes HP 1050. La séparation des acides aminés a été effectuée à l'aide de deux colonnes en série, de type lichrocart 125-4 cartridge contenant une colonne Lichrospher 100 RP18. La longueur de chacune de ces colonnes est de 10 cm et le diamètre des particules est de 5 µm. Une précolonne de même type a été placée au début de chaque colonne. Les dérivés "précolonne" à l'OPA de ces substances ont été détectés à l'aide d'un spectrofluorimètre Jasco, modèle 821-FP. Un système d'acquisition de données (logiciel) HP chemstation et une imprimante complètent l'appareillage utilisé.

Mode et conditions opératoires: Le réactif de dérivation, la solution tampon, l'eau milli-Q pour le rinçage, les échantillons et les solutions de référence sont introduits dans des flacons en verre de 2 ml. Ces flacons sont à la suite placés dans le carrousel du passeur/préparateur d'échantillons. L'élution se fait suivant le gradient ci-après.

Temps (min)	Eluant A (%)	Eluant B (%)	Débit (ml·min ⁻¹)
0	90	10	0,6
45	60	40	0,6
70	35	65	0,6
75	10	90	0,6
80	10	90	0,6
83	90	10	0,6
85	90	10	0,6

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'un minimum de 7 solutions d'étalonnage analysées en double. Pour chaque série d'analyses (carrousel) la vérification de la pente des courbes d'étalonnage doit être réalisée.

Programme d'injection: 2 µl de vin réagit avec 4 µl de la solution d'OPA à température ambiante et à pH 10,4 (2 µl tampon borate décrite ci-dessus). Après 2 agitations successives, suivies chaque fois d'une attente de 2,5 min, le mélange de 8 µl est injecté automatiquement. Pour la détection des pics, l'excitation a été faite à la longueur d'onde de 340 nm et l'émission à 450 nm.

Tableau 1

Composition de la solution de référence des acides aminés
Amino acid composition of the standard solution

Acides aminés	mg.l ⁻¹	Acides aminés	mg.l ⁻¹
Acide Aspartique	76	Tyrosine	52
Acide Glutamique	75	Valine	35
Asparagine	81	Ethanolamine	57
Serine	71	Méthionine	36
Glutamine	50	Tryptophane	56
Histidine	61	Phénylalanine	57
Glycine	51	Isoleucine	70
Thréonine	60	Leucine	80
Arginine	57	Ornithine	75
Alanine	307	Lysine	97
γ-amino-butyrique	35		

Positionnement des échantillons dans le carrousel passeur/préparateur d'échantillons : 1: réactif de dérivation; 2: eau de rinçage; 3: tampon; 4 et plus: échantillons et solutions de calibration.

Calcul des concentrations: Les chromatogrammes (Fig. 1a et b) sont enregistrés par ordinateur et les surfaces des pics sont calculées automatiquement à partir de solutions de références de teneurs connues. Les concentrations sont exprimées en mg.l⁻¹.

Discussion: La méthode permet de doser 16 échantillons en 24 h. Grâce à l'automatisation la procédure analytique est parfaitement stable ce qui diminue les problèmes souvent rencontrés pour l'identification des certains pics dus au changement des temps de rétention au cours des analyses. Le faible volume d'injection lié à la composition des réactifs ainsi que le processus de rinçage après chaque série d'analyse ont permis d'augmenter, de façon nette, la durée de vie des colonnes chromatographiques.

Caractérisation de la méthode

Praticabilité: Il s'agit d'une caractéristique non typique d'une méthode d'analyse. Les réactifs, les solvants et le matériel nécessaires sont disponibles sur le marché, ils sont d'un coût modéré, il n'est pas nécessaire de faire appel à des produits ou des producteurs spécifiques, la méthode est donc praticable (ANONYME 1989).

Spécificité: C'est la capacité pour une méthode de discerner l'analyte à mesurer des autres substances (ANONYME 1989). Nous avons évalué la possibilité d'interférence d'autres composés susceptibles d'être dérivés par l'OPA, notamment les amines biogènes. Dans les conditions de séparation prescrites, ces composés sortent surtout après la lysine sans causer aucun problème. On pense donc pouvoir affirmer que la méthode est spécifique.

Courbes d'étalonnage (linéarité): Six solutions préparées par nous mêmes ont été analysées en

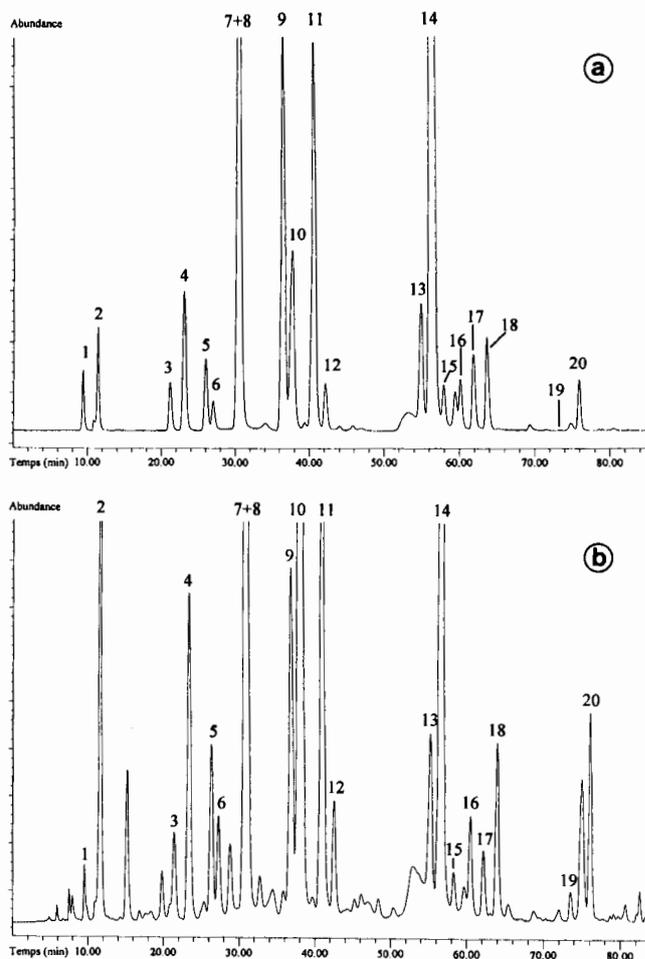


Fig. 1: Chromatogrammes des acides aminés d'une solution de référence (a) et d'un vin rouge (b). Identifications des pics: 1. Acide Aspartique 2. Acide Glutamique 3. Asparagine 4. Serine 5. Glutamine 6. Histidine 7. Glycine 8. Thréonine 9. Arginine 10. Alanine 11. Acide γ-aminobutyrique 12. Tyrosine 13. Valine 14. Ethanolamine + Méthionine 15. Tryptophane 16. Phénylalanine 17. Isoleucine 18. Leucine 19. Ornithine 20. Lysine.

Chromatograms of amino acids of a standard solution (a) and a red wine (b).

double et respectant les conditions de répétabilité (ANONYME 1993 a). Une solution de base ne contenant pas d'acides aminés "blanc biologique" a également été analysée en double. En tout nous disposons donc de 14 points respectivement pour établir les équations des courbes d'étalonnage. Les données et les résultats correspondants sont présentés dans les Tab. 2-4. Nous présentons également quelques courbes d'étalonnage à titre d'exemple, ainsi que les coefficients (Rval) de linéarité des courbes (Fig. 2).

Le calcul du modèle mathématique et les valeurs des paramètres compris dans un intervalle de confiance de 95 p.100 (Tab. 2 et 3) a été effectué selon la méthode décrite par PEREIRA MONTEIRO et BERTRAND (1994).

$$E = (Y/y_i) = a + b x_i \text{ où } Y_i = a + b x_i + e_i$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}; \quad \bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

$$\hat{\beta} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\hat{a} = \bar{y} - \hat{\beta}\bar{x}$$

$$\rho = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - \hat{\beta}^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 2}}$$

$$\Delta\alpha = (t_{0,975}; \nu = N-2) * \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\Delta\beta = (t_{0,975}; \nu = N-2) * \hat{\sigma} \frac{1}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

(x_i, y_i) = point de la gamme d'étalonnage

N = nombre de points de la gamme d'étalonnage

$\hat{\beta}$ = valeur estimée de la pente de la droite d'étalonnage

\hat{a} = valeur estimée de l'ordonnée à l'origine

ρ = coefficient de corrélation

$\hat{\sigma}$ = erreur du modèle

Discussion : Ces résultats montrent que le coefficient de corrélation (ρ) est supérieur (à deux exceptions près) à 0,99 (allant de 0,994 à 0,9998) (Tab. 3). De plus, l'intervalle de tolérance à 95 p. 100 de $\hat{\beta}$ contient l'origine. L'intervalle d'amplitude $2\Delta\beta$ est négligeable lorsqu'il est comparé à l'amplitude de la gamme de travail choisie (le coefficient de variation $\Delta\beta/\beta$, qui doit être inférieur à 5 %, varie de 1,29 à 7 %, à deux exceptions près, pour tous les acides aminés) (Tab. 3). On peut donc affirmer que les courbes d'étalonnage sont satisfaisantes.

Mais le coefficient de corrélation ne suffit pas à lui seul pour vérifier la linéarité de la courbe; il faut réaliser l'analyse de variance des données (ANOVA) pour montrer la proportionnalité des surfaces de pics aux concentration en acides aminés.

Analyse de variance des données (ANOVA) (Tab. 4):

Variation totale: $\sum (y_i - \bar{y})^2$

Nombre de degrés de liberté: $\nu = N-1$ (ici 13).

Variation autour du modèle:

$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum (y_i - \bar{y})^2 - \hat{\beta}^2 \sum (x_i - \bar{x})^2$

Nombre de degrés de liberté: $\nu = N-2$ (ici 12).

Variation due à l'erreur pure:

$$\frac{\sum (y_{i1} - y_{i2})^2}{2}$$

Les indices i_1 et i_2 correspondent à une répétition de la même teneur ($p=2$).

Nombre de degrés de liberté: ν = Nombre de points de la gamme (p répétitions-1) (ici 7).

Variation due à l'erreur de l'ajustement = Variation autour du modèle - Variation due à l'erreur pure. Nombre de degrés de liberté: ν = Nombre de degrés de liberté autour du modèle - Erreur pure (ici 5).

Variation expliquée par le modèle = Variation totale - Variation autour du modèle. Nombre de degrés de liberté: $\nu = N-1 - (N-2)$ (ici 1). Variance = Variation/ Nombre de degrés de liberté.

Source de variation	Variation	ν	Variance	F Snedecor
Autour du modèle	xxxxxx	12	v_1	
Erreur pure	xxxxxx	7		
Erreur de l'ajustement	xxxxxx	5		
Expliquée par le modèle	xxxxxx	1	v_2	v_2/v_1
Total	xxxxxxxx	13	v_1+v_2	

Ainsi la variation résiduelle (autour du modèle) est décomposée en deux parties: l'une concerne les erreurs de mesures instrumentales (erreur pure) et l'autre mesure la proximité entre le modèle réel et le modèle linéaire (erreur de l'ajustement). Le Tab. 4 montre cette étude pour les acides aminés. Etant donné que le F calculé est supérieur au F de Snedecor à 99,5 p. 100 de probabilité (22, 2 et 37 respectivement pour 1; 12 et 1; 7 degrés de liberté), le modèle (droite) est acceptable. La décomposition de la variation autour du modèle en "erreur pure" et en "erreur de l'ajustement", montre que ces deux erreurs ne sont pas du même ordre mais elles ont une valeur relativement faible. L'adoption de la droite comme modèle est alors justifiée.

Zone de travail de la courbe d'étalonnage : Elle est fixée par les solutions d'étalonnage. Le modèle mathématique "droite" qui décrit la courbe est valable tout au long de celle-ci, dans notre cas, pour l'acide aminé le plus abondant de 7,7 à 184,2 mg.l⁻¹.

Variabilité des paramètres de la courbe d'étalonnage au cours du temps : Nous avons réalisé deux courbes d'étalonnage à 4 jours d'intervalle. La pente des droites reste presque inchangée (Fig. 3).

Détermination des seuils ou limites analytiques : Suivant AFNOR (Association Française de Normalisation; ANONYME 1993 a), norme V03-110 et J.O.C.E. (ANONYME 1989) il faut déterminer le seuil de détection, le seuil de détermination et le seuil de quantification. Suivant TUSSEAU (1995), il est préférable de parler de "limite" et non pas de "seuil", de plus, le seuil de détermination serait sans intérêt. Nous déterminons donc la limite de détection et la limite de quantification.

Le seuil ou la limite de détection est égal à la moyenne de la teneur mesurée d'échantillons témoins représentatifs (blancs biologiques) ($n \geq 20$) augmentée de trois fois l'écart-type de la moyenne ($X_0 + 3S_0$) (ANONYME 1989). Suivant la

Tableau 2

Concentrations (X) en mg·l⁻¹ des diverses dilutions de la solution mère injectées deux fois et surfaces (Y) des pics correspondants
 Concentrations (X) (mg·l⁻¹) of different dilutions of the initial standard solution injected two times and corresponding peak areas (Y)

Acides aminés	Diverses dilutions injectées deux fois							Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₁₄
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇														
Acide Aspartique	0,0	9,5	18,9	37,9	43,3	50,5	60,6	0	30	54	98	107	121	135	0	28	52	91	106	119	137
Acide Glutamique	0,0	9,4	18,8	37,6	43,0	50,2	60,2	0	46	86	158	173	195	221	0	44	83	150	172	192	223
Asparagine	0,0	10,1	20,2	40,4	46,1	53,8	64,6	0	51	96	177	195	218	248	0	48	93	169	195	218	252
Serine	0,0	8,8	17,6	35,3	40,3	47,0	56,4	0	83	160	304	333	381	441	0	82	159	292	334	376	444
Glutamine	0,0	6,3	12,6	25,1	28,7	33,5	40,2	0	48	93	172	191	215	247	0	47	88	161	184	207	240
Histidine	0,0	7,6	15,2	30,4	34,7	40,5	48,6	0	17	33	62	70	78	91	0	17	32	59	69	76	90
Glycine	0,0	6,3	12,7	25,4	29,0	33,8	40,6	0	94	204	408	465	558	668	0	97	209	407	469	546	660
Thréonine	0,0	7,5	15,0	30,0	34,3	40,0	48,0	0	45	77	149	160	172	208	0	46	79	148	161	169	205
Arginine	0,0	7,1	14,1	28,3	32,3	37,7	45,2	0	74	151	280	308	325	388	0	78	149	277	304	335	398
Alanine	0,0	7,1	14,1	28,3	32,3	37,7	45,2	0	26	51	103	118	155	156	0	23	47	85	107	119	145
γ-amino-butérique	0,0	4,4	8,8	17,5	20,0	23,3	28,0	0	50	104	212	238	281	338	0	52	106	209	237	270	332
Tyrosine	0,0	6,4	12,9	25,8	29,4	34,3	41,2	0	31	56	106	118	131	149	0	29	56	100	114	127	148
Valine	0,0	4,4	8,8	17,5	20,0	23,3	28,0	0	66	128	244	254	289	330	0	64	127	243	245	285	334
Ethanolamine	0,0	8,2	16,4	32,8	37,4	43,7	52,4	0	121	257	541	595	709	866	0	125	267	534	593	678	843
Tryptophane	0,0	6,9	13,9	27,8	31,7	37,0	44,4	0	21	40	76	85	95	109	0	20	39	71	81	89	103
Phénylalanine	0,0	7,1	14,3	28,5	32,6	38,0	45,6	0	29	54	101	112	123	138	0	28	52	95	107	119	138
Isoléucine	0,0	8,8	17,5	35,0	40,0	46,7	56,0	0	51	94	172	191	214	244	0	48	90	164	189	210	244
Leucine	0,0	10,0	20,0	40,0	45,7	53,3	64,0	0	61	115	214	236	268	306	0	60	113	206	234	261	305
Ornithine	0,0	9,4	18,8	37,5	42,9	50,0	60,0	0	24	41	67	91	98	108	0	29	66	82	88	93	103
Lysine	0,0	12,1	24,1	48,3	55,1	64,3	77,2	0	27	55	105	118	139	162	0	28	55	103	117	132	158

Tableau 3
Paramètres des courbes d'étalonnage
Parameters of calibration curves

Acides aminés	$\hat{\beta}$	\hat{a}	\bar{n}	$\hat{\sigma}$	$\Delta\alpha$	$\Delta\beta$	$\Delta\beta/\hat{\beta}$
Acide Aspartique	2,24	6,32	0,99558	4,75	5,03	0,13	0,0594
Acide Glutamique	3,69	8,97	0,99648	6,92	7,33	0,20	0,0530
Asparagine	3,88	9,46	0,99663	7,65	8,10	0,20	0,0518
Serine	7,83	12,26	0,99831	9,51	10,07	0,29	0,0366
Glutamine	6,06	8,40	0,99677	7,27	7,70	0,31	0,0507
Histidine	1,86	2,54	0,99792	2,16	2,29	0,08	0,0406
Glycine	16,37	-4,00	0,99979	5,04	5,34	0,21	0,0129
Thréonine	4,21	10,47	0,99377	8,40	8,89	0,30	0,0706
Arginine	8,65	15,79	0,99512	14,36	15,20	0,54	0,0624
Alanine	3,43	0,37	0,98607	9,69	10,26	0,36	0,1062
γ -amino-butérique	11,92	-0,16	0,99968	3,12	3,30	0,19	0,0159
Tyrosine	3,61	5,86	0,99625	4,78	5,06	0,20	0,0547
Valine	11,84	13,84	0,99443	13,02	13,78	0,79	0,0667
Ethanolamine	16,22	-4,34	0,99929	11,85	12,54	0,38	0,0237
Tryptophane	2,40	3,72	0,99537	3,82	4,04	0,15	0,0608
Phénylalanine	3,04	6,08	0,99488	5,22	5,53	0,19	0,0639
Isoleucine	4,36	9,59	0,99669	7,37	7,80	0,22	0,0513
Leucine	4,77	11,09	0,99720	8,49	8,98	0,23	0,0472
Ornithine	1,72	9,89	0,96987	9,60	10,16	0,27	0,1581
Lysine	2,07	2,55	0,99907	2,56	2,71	0,06	0,0272

$\hat{\beta}$ = Valeur estimée de la pente de la droite d'étalonnage \hat{a} = Valeur estimée de l'ordonnée à l'origine

r = Coefficient de corrélation; $\hat{\sigma}$ = Erreur du modèle $\Delta\alpha$ et $\Delta\beta$: voir page 46 $\Delta\beta/\hat{\beta}$ = Coefficient de variation

législation française (norme V03-110, AFNOR, ANONYME 1993 a) on estime que le seuil de détection est égal uniquement à trois fois l'écart-type (3So).

Il s'agit du niveau le plus faible auquel la "réponse" due à la substance à doser se distingue encore des "réponses" dues au "bruit de fond" de l'appareillage ou au blanc (TUSSEAU 1995; Codex CCMAS, ANONYME 1991 a, b). Autrement dit, la limite de détection est la teneur minimale mesurée à partir de laquelle il est possible de déduire la présence de l'analyte avec une certitude statistique raisonnable (au moins 95 p. 100 pour les substances non autorisées) (ANONYME 1989 et 1993), mais non nécessairement quantifiée comme valeur exacte (norme V03-110, AFNOR, ANONYME 1993 a).

Les acides aminés ont leur origine dans les raisins. Nous ne pouvons, donc, pas disposer d'un "blanc biologique" c'est-à-dire d'un vin exempt d'acides aminés. Pour cette raison nous avons utilisé un "blanc synthétique" contenant 10 % vol d'alcool, 5 g·l⁻¹ de glycérol et 3 g·l⁻¹ d'acide tartrique. Son pH est ajusté à 3,5. Les résultats issus de 20 analyses de ce même "blanc biologique" sont présentés au Tab. 5.

Le seuil ou la limite de quantification correspond à la plus petite concentration mesurée au dessus de ($X_0 + 10S_0$) ($n \approx 20$), pour laquelle une détermination de l'analyte est possible avec le degré d'exactitude et de répétabilité (en laboratoire) définis ci-dessous (ANONYME 1989). Suivant la législation française (norme V03-110, AFNOR, ANONYME 1993 a) on estime que le seuil de quantification est égal unique-

ment à dix fois l'écart-type (10So). Par ailleurs, trois dilutions de la solution de référence des acides aminés (1/100, 1/50 et 1/25 ayant respectivement les concentrations théoriques 37,4-83,4; 74,8-166,8 et 149,6-333,6 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) ont été analysées quatre fois chacune. Ces résultats, malgré les concentrations extrêmement petites que nous avons eu à traiter, montrent qu'ils sont dans la plupart de cas proportionnels (Tab. 6).

Toutefois, on peut remarquer que les concentrations de certaines substances ne sont pas proportionnelles d'une dilution à l'autre, elles sont pratiquement identiques, noyées dans le "bruit de fond". Cela veut dire que leur seuil de quantification est plus élevé que les teneurs contenues dans les dilutions analysées.

Fidélité de la méthode d'essai: La répétabilité a été évaluée à partir de 10 dosages d'une solution de référence dans des conditions d'opération constantes. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tab. 7. Les valeurs trouvées pour le coefficient de variation (CV) de la moyenne sont comprises entre 2,29 et 7,25 %. Elles sont donc bien en dessous de la limite recommandée (CV = 0,15 ou 15 %) pour des échantillons de concentrations supérieures à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ANONYME 1989) pour tous les acides aminés analysés.

Fig. 2: Linéarité de la méthode pour le dosage des acides aminés.

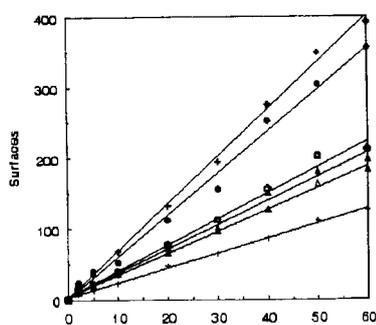
Linearity of the amino acid determination method.

Tableau 4

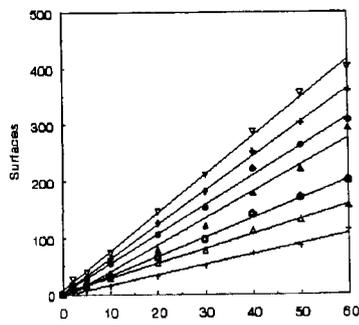
Analyse de variance pour chercher les sources d'erreurs lors du dosage des acides aminés
 Variance analysis to find the sources of error of the amino acid determination

Acides aminés	1 Variation Total (*)	2 Variation autour du modèle (droite)	3 Variation due à l'erreur pure	4 Variation due à l'erreur de l'ajustement	5 Variation expliquée par le modèle	6 Variance autour du modèle	7 Variance expliquée par le modèle	8 Variance Total	9 F Snedecor expliquée par le modèle
Acide Aspartique	30664	271	33	238	30393	23	30393	30416	1348
Acide Glutamique	81770	575	46	530	81194	48	81194	81242	1694
Asparagine	104366	703	49	654	103663	59	103663	103721	1769
Serine	322393	1086	91	996	321307	91	321307	321397	3549
Glutamine	984703	634	155	480	97836	53	97836	97889	1851
Histidine	13515	56	8	48	13459	5	13459	13464	2880
Glycine	727700	305	130	176	727395	25	727395	727421	28609
Thréonine	68145	847	13	835	67298	71	67298	67369	953
Arginine	253877	2473	123	2351	251404	206	251404	251610	1220
Alanine	40753	1128	944	184	39625	94	39625	39719	422
γ-amino-butérique	183592	117	88	29	183475	10	183475	183485	18867
Tyrosine	36680	275	37	238	36406	23	36406	36429	1591
Valine	183087	2034	60	1974	181054	170	181054	181223	1068
Ethanolamine	1190896	1684	830	854	1189213	140	1189213	1189353	8475
Tryptophane	18912	175	58	117	18738	15	18738	18752	1286
Phénylalanine	32041	327	41	286,0	31714	27	31714	31741	1164
Isoleucine	98640	651	55	597	97988	54	97988	98043	1806
Leucine	154345	864	62	803	153481	72	153481	153553	2131
Ornithine	18639	1106	467	639	17533	92	17533	17625	190
Lysine	42077	79	36	43	41999	7	41999	42005	6420

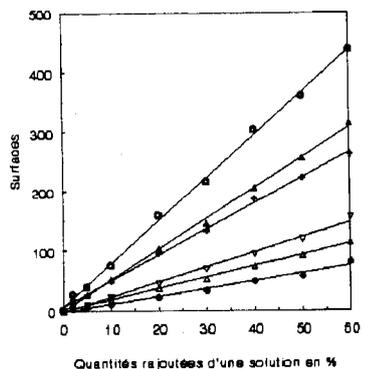
(*) Voir explications page 46 Colonnes : 1=3+4+5; 2=3+4; 4=2-3; 5=1-2; 8=6+7



+ Ac. Aspartique Δ Ac. Glutamique ● Asparagine
 + Serine ▲ Glutamine ● Histidine*4

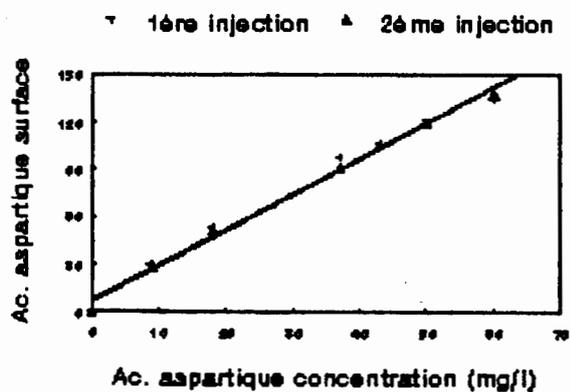


+ Glycine /5 ▲ Thréonine □ Arginine + Alanine /5
 ▲ γ-amino-butérique ● Tyrosine x2 ▽ Valine x1.5

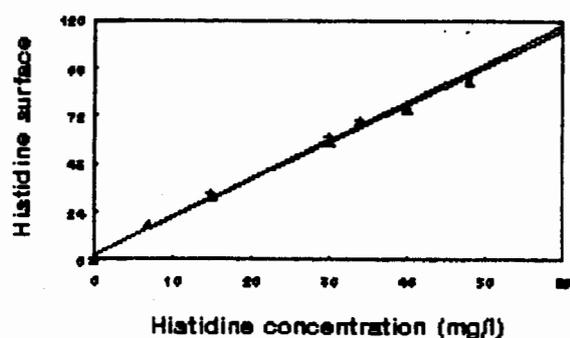


Δ Tryptophane □ Phénylalanine x3 + Isoleucine
 ▲ Leucine ● Ornithine ▽ Lysine

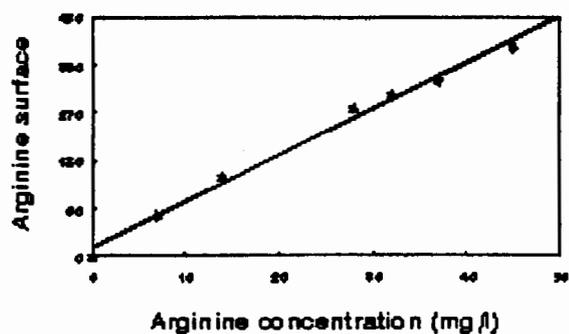
Acides aminés	Rval
Acide Aspartique	0,9989
Acide Glutamique	0,9989
Asparagine	0,9960
Serine	0,9987
Glutamine	0,9967
Histidine	0,9960
Glycine	0,9970
Thréonine	0,9984
Arginine	0,9989
Alanine	0,9996
γ-amino-butérique	0,9956
Tyrosine	0,9989
Valine	0,9988
Ethanolamine	0,9916
Tryptophane	0,9990
Phénylalanine	0,9991
Isoleucine	0,9990
Leucine	0,9992
Ornithine	0,9933
Lysine	0,9972



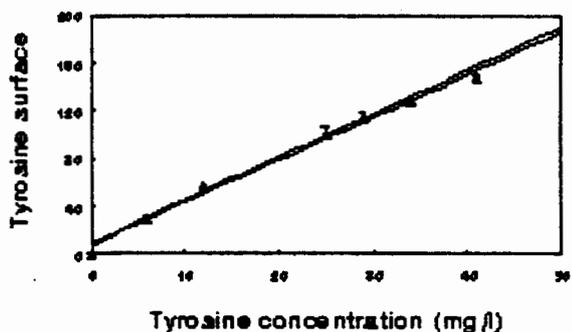
$f(x)=8,54E+0*x+1,54E+1$ $R^2=9,90E-1$ (28 Fév '94)
 $f(x)=8,72E+0*x+1,57E+1$ $R^2=9,92E-1$ (3 mars '94)



$f(x)=1,88E+0*x+2,62E+0$ $R^2=9,95E-1$ (28 Fév '94)
 $f(x)=1,84E+0*x+2,35E+0$ $R^2=9,97E-1$ (3 mars '94)



$f(x)=2,21E+0*x+7,71E+0$ $R^2=9,89E-1$ (28 Fév '94)
 $f(x)=2,23E+0*x+5,88E+0$ $R^2=9,94E-1$ (3 mars '94)



$f(x)=3,73E+0*x+5,77E+0$ $R^2=9,95E-1$ (28 Fév '94)
 $f(x)=3,63E+0*x+5,18E+0$ $R^2=9,96E-1$ (3 mars '94)

Tableau 5

Seuils ou limites analytiques déterminés à partir d'un «blanc biologique» (mg·l⁻¹)

Analytical limits of reference sample (blank) (mg·l⁻¹)

Acides aminés	Moyenne (X)	Ecart-type (S)	Limite de détection X+3S	Limite de quantification X+10S
Ac. Aspartique	0,2363	0,0293	0,3243	0,5297
Ac. Glutamique	0,0682	0,0240	0,1402	0,3082
Asparagine	0,0690	0,0313	0,1629	0,3820
Sérine	0,3204	0,1243	0,6934	1,5638
Glutamine	0,0415	0,0137	0,0827	0,1789
Histidine	0,4229	0,2382	1,1374	2,8045
Glycine	0,1145	0,0592	0,2920	0,7063
Thréonine	0,1362	0,0509	0,2889	0,6453
Arginine	0,0710	0,0300	0,1609	0,3706
Alanine	0,0781	0,0300	0,1681	0,3782
γ-aminobutyrique	0,0709	0,0304	0,1621	0,3749
Tyrosine	0,1573	0,0705	0,3688	0,8624
Valine	0,0415	0,0132	0,0811	0,1737
Méthionine	0,0156	0,0062	0,0342	0,0777
Ethanol-amine	0,0437	0,0212	0,1074	0,2560
Tryptophane	0,0521	0,0275	0,1345	0,3267
Phénylalanine	0,0551	0,0368	0,1656	0,4235
Isoleucine	0,0161	0,0097	0,0450	0,1126
Leucine	0,0436	0,0189	0,1003	0,2324
Ornithine	0,2335	0,1747	0,7577	1,9809
Lysine	0,0425	0,0188	0,0988	0,2302

L'estimation de la variabilité intralaboratoire a été effectuée à partir de trois analyses en double d'un vin (B58) réalisées sur 3 jours, avec un intervalle de 15 jours entre le premier et le dernier. Les déterminations ont été effectuées par le même analyste. Les résultats obtenus pour l'ensemble des acides aminés figurent dans le Tab. 8.

Les valeurs du coefficient de variation montrent qu'il existe peu d'écart entre les valeurs de surfaces trouvées dans les différents jours, tout au moins pour la plupart des acides aminés.

Conclusions

Le dosage des acides aminés libres a été effectué après la dérivation proclamée à l'aide de l'OPA et de la détection par fluorimétrie. Cette méthode nous a permis une bonne séparation et le dosage de certains acides aminés précurseurs des amines biogènes et certains autres acides aminés précurseurs des alcools qui influencent la qualité du vin.

La méthode proposée est automatisée et pratique. Les résultats obtenus montrent qu'elle est spécifique, précise, avec une bonne linéarité et une bonne répétabilité. La variabilité intralaboratoire est également satisfaisante.

Fig. 3: Evolution des courbes d'étalonnage au cours du temps, pour certains acides aminés.

Changes of calibration curves of amino acids during 4 d.

Tableau 6

Seuils ou limites analytiques déterminés à partir des dilutions diverses d'une solution de référence (mg·l⁻¹)Analytic limits of different dilutions of the initial standard solution (mg·l⁻¹)

Dilutions :	1:100				1:50				1:25			
	Moy	Ecart-type (S)	X+3S	X +10S	Moy	Ecart-type (S)	X+3S	X+0S	Moy	Ecart-type (S)	X+3S	X+10S
Ac. Aspartique	0,122	0,023	0,190	0,348	0,207	0,011	0,239	0,314	0,290	0,068	0,493	0,968
Ac. Glutamique	0,087	0,021	0,148	0,292	0,172	0,017	0,224	0,346	0,342	0,023	0,412	0,576
Asparagine	0,151	0,035	0,256	0,499	0,191	0,036	0,299	0,551	0,295	0,036	0,402	0,651
Sérine	0,254	0,037	0,364	0,622	0,341	0,094	0,623	1,283	0,393	0,074	0,614	1,131
Glutamine	0,085	0,016	0,133	0,247	0,140	0,021	0,203	0,352	0,207	0,017	0,257	0,375
Histidine	0,529	0,160	1,009	2,130	0,529	0,089	0,795	1,418	0,692	0,089	0,959	1,582
Glycine	0,107	0,037	0,219	0,481	0,223	0,037	0,333	0,591	0,390	0,023	0,460	0,622
Thréonine	0,227	0,067	0,427	0,895	0,102	0,065	0,298	0,757	0,144	0,031	0,239	0,459
Arginine	0,100	0,026	0,178	0,358	0,117	0,011	0,149	0,223	0,187	0,021	0,251	0,400
Alanine	0,079	0,023	0,149	0,313	0,094	0,009	0,121	0,185	0,181	0,003	0,190	0,212
γ-amino-butyrrique	0,099	0,010	0,128	0,196	0,115	0,033	0,213	0,442	0,161	0,023	0,232	0,396
Tyrosine	0,147	0,039	0,264	0,537	0,216	0,071	0,430	0,929	0,192	0,026	0,271	0,454
Valine	0,087	0,041	0,211	0,500	0,147	0,033	0,247	0,479	0,243	0,014	0,286	0,387
Méthionine	0,009	0,003	0,018	0,038	0,009	0,003	0,018	0,038	0,011	0,005	0,026	0,059
Ethanol-amine	0,030	0,006	0,049	0,094	0,028	0,007	0,048	0,095	0,019	0,006	0,039	0,084
Tryptophane	0,041	0,011	0,073	0,147	0,053	0,023	0,122	0,281	0,101	0,044	0,234	0,545
Phénylalanine	0,044	0,009	0,070	0,131	0,039	0,005	0,054	0,089	0,080	0,028	0,165	0,362
Isoleucine	0,031	0,016	0,078	0,187	0,038	0,012	0,074	0,158	0,080	0,012	0,115	0,198
Leucine	0,059	0,026	0,138	0,323	0,066	0,010	0,095	0,164	0,125	0,008	0,148	0,203
Ornithine	0,134	0,024	0,206	0,372	0,412	0,115	0,757	1,563	0,294	0,040	0,414	0,694
Lysine	0,031	0,006	0,049	0,093	0,050	0,018	0,104	0,229	0,023	0,008	0,048	0,106

X+3S : Seuil ou limite de détection

X+10S : Seuil ou limite de quantification

Tableau 7

Répétabilité intralaboratoire pour le dosage de chaque acide aminé. Les valeurs représentent les surfaces des pics correspondants
 Intralaboratory repeatability of the determination of each amino acid. The values represent the areas of the corresponding peaks

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moy	Ecart-type	CV%
Acide Aspartique	45	45	44	43	42	42	42	41	41	38	42,3	2,11	4,99
Acide Glutamique	77	79	77	74	71	71	71	70	69	64	72,3	4,50	6,22
Asparagine	86	87	85	82	79	79	79	78	78	73	80,6	4,35	5,40
Serine	173	177	172	167	164	163	162	159	158	148	164,3	8,46	5,15
Glutamine	105	107	103	99	96	95	95	92	91	84	96,7	7,01	7,25
Histidine	35	36	36	34	34	35	35	33	33	31	34,2	1,55	4,53
Glycine	607	615	610	597	591	598	585	574	573	546	589,6	20,90	3,55
Arginine	117	120	117	112	111	112	110	106	107	100	111,2	5,94	5,34
Alanine	105	108	105	101	99	100	98	96	96	90	99,8	5,29	5,30
γ -amino-butyrique	239	243	239	235	232	229	228	223	225	213	230,6	8,97	3,89
Tyrosine	56	56	54	52	50	50	50	49	49	46	51,2	3,26	6,37
Ethanolamine	1059	1041	1052	1045	1050	1015	1031	1014	1022	981	1031	23,59	2,29
Tryptophane	41	43	42	41	40	38	39	38	38	36	39,6	2,17	5,48
Phénylalanine	50	52	50	49	48	47	47	46	46	43	47,8	2,57	5,38
Isoleucine	89	91	88	85	84	83	82	79	80	75	83,6	4,90	5,87
Leucine	126	128	124	120	118	116	116	113	114	106	118,1	6,64	5,62
Ornithine	38	38	38	37	34	35	36	36	35	32	35,9	1,97	5,49
Lysine	60	64	65	62	61	59	61	59	59	53	60,3	3,30	5,48

CV : Coefficient de variation

Tableau 8

Variabilité intralaboratoire pour le dosage des acides aminés sur une période de 2 semaines. Les valeurs représentent les surfaces des pics correspondants

Intralaboratory variability of the determination of amino acids in a 2-week period. The values represent the areas of the corresponding peaks

	Vin B58 11-2-94	Vin B58 14-2-94	Vin B58 25-2-94	Moy	Ecart-type (S)	CV%
Acide Aspartique	15	14	18	15,67	2,08	8,86
Acide Glutamique	93	84	90	89,00	4,58	3,43
Asparagine	43	40	33	38,67	5,13	8,85
Sérine	48	45	40	44,33	4,04	6,08
Glutamine	0,7	0,5	0,4	0,53	0,15	19,09
Histidine	18	16	12	15,33	3,06	13,28
Glycine+Thréonine	296	291	270	285,67	13,80	3,22
Arginine	309	313	287	303,00	14,00	3,08
Alanine	18	17	23	19,33	3,21	11,08
γ -amino-butyrique	268	261	255	261,33	6,51	1,66
Tyrosine	14	13	16	14,33	1,53	7,10
Valine	31	28	29	29,33	1,53	3,47
Ethanolamine+Méthionine	423	429	418	423,33	5,51	0,87
Tryptophane	1	1	0,5	0,83	0,29	23,09
Phénylalanine	24	22	18	21,33	3,06	9,55
Isoleucine	14	12	10	12,00	2,00	11,11
Leucine	43	40	55	46,00	7,94	11,50
Ornithine	31	30	35	32,00	2,65	5,51
Lysine	30	30	34	31,33	2,31	4,91

CV : Coefficient de variation

Références

- ANONYME; 1986: ISO 5725. Application de la statistique. Fidélité des méthodes d'essai. Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais intralaboratoire.
- ; 1987: AFNOR. Application de la statistique. Fidélité des méthodes d'essai. Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais intralaboratoire.
- ; 1989: Journal Officiel des Communautés Européennes; 1989: N° L 351/39.
- ; 1991 a: CCMAS. 17^e session du Codex Committee for Methods of Analyses and Sampling. Comité du Codex Alimentarius-ALI-NORM 93/23, p.7 et document de séance 3.
- ; 1991 b: CCMAS. 18^e session du Codex Committee for Methods of Analyses and Sampling. Comité du Codex Alimentarius-ALI-NORM 93/23, p.10 et document CX/MAS 92/10 et 92/10 add1.
- ; 1993 a: AFNOR. Analyse des produits alimentaires. Protocole d'évaluation des méthodes alternatives d'analyse quantitative par rapport à une méthode de référence, norme V03-110, 21.
- ; 1993 b: Journal Officiel des Communautés Européennes; 1993: N° L 118/68.
- BAUZA, T.; BLAISE, A.; TEISSÈDRE, P. L.; CABANIS, J. C.; KANNY, G.; MONERET-VAUTRIN, D. A.; DAUMAS, F.; 1995: Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité. Bull. OIV **68** (767-768), 42-67.
- BUTEAU, C.; DUTSCHAUVER, C. L.; ASHTON, G. C.; 1984: A study of biogenesis of amines in a Villard noir wine. Amer. J. Enol. Viticult. **35** (4), 228-236.
- CALULL, M.; FABREGAS, J.; MARCÉ, R. M.; BORRUL, F.; 1991: Determination of free amino acids by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. Application to wine samples. Chromatographia **31** (5-6), 272-276.
- DRDÁK, M.; RAJNIAKOVÁ, A.; KAROVICOVÁ, J.; BUCHTOVÁ, V.; HRDLOVIC, R.; 1992: Freie Aminosäuren in Rotweinen aus dem Gebiet der Kleinen Karpaten der Slowakei. Mitt. Klosterneuburg **42**, 161-164.
- ETIÉVANT, P.; SCHLICH, P.; BOUVIER, J. C.; SYMONDS, P.; BERTRAND, A.; 1988: Varietal and geographic classification of French red wines in terms of elements, amino acids and aromatic alcohols. J. Sci. Food Agricult. **45**, 25-41.
- HUANG, Z.; OUGH, C. S.; 1989: Effect of vineyard locations, varieties and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. Amer. J. Enol. Viticult. **40** (2), 135-139.
- LAFON-LAFOURCADE, S.; 1975: L'histamine des vins. Conn. Vigne Vin **9** (2), 103-115.
- LEHTONEN, P.; SAARIMEN, M.; VESANTO, M.; RIEKKOLA, M. L.; 1992: Determination of wine amines by HPLC using automated precolumn derivatization with *o*-phthaldehyde and fluorescence detection. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **194**, 434-437.
- MARCÉ, R. M.; CALULL, M.; GUASCH, J.; BORRULL, F.; 1989: Determination of free amino acids in wine by HPLC using precolumn derivatization with phenylthiocyanate. Amer. J. Enol. Viticult. **40** (3), 194-198.
- MAYER, K.; PAUSE, G.; 1973: Nicht-flüchtige biogene Amine in Wein. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **64**, 171-179.
- ; --; 1978: Bentonitbehandlung von Wein: Einfluss auf den Gehalt an biogenen Aminen. Schweiz. Z. Obst- Weinbau **114**, 544-547.
- MAYNARD, L. S.; SCHENKER, V. J.; 1962: Monoamine-oxidase inhibition by ethanol *in vitro*. Nature **196**, 575-6.
- OUGH, C. S.; DAUDT, C. E.; 1981: Quantitative determination of volatile amines in grapes and wines. I. Effect of fermentation and storage temperature on amine concentration. Amer. J. Enol. Viticult. **32** (3), 185-188.
- PEREIRA MONTEIRO, M. J.; BERTRAND, A.; 1994: Validation d'une méthode de dosage. Application à l'analyse des amines biogènes du vin. Bull. O.I.V. **67** (765-766), 916-962.
- POGORZELSKI, E.; 1992: Studies of the formation of histamine in must and wines from elderberry fruit. J. Sci. Food Agricult. **60**, 239-244.
- PUPUTI, E.; SUOMALAINEN, H.; 1969: Über die biogenen Amine der Weine. Mitt. Klosterneuburg **19**, 184-92.
- RADLER, F.; 1975: The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. (Eds): Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, 17-27. Academic Press, London.
- RIZZON, L. A.; 1985: Incidence de la macération sur la composition chimique des vins. Thèse Docteur-Ingénieur en Oenologie-Ampélogie. Univ. Bordeaux II.
- SANDERS, E. M.; OUGH, C. S.; 1985: Determination of free amino acids in wine by HPLC. Amer. J. Enol. Viticult. **36** (1), 43-46.
- SOUFLEROS, E.; BARRIOS, M. L.; BERTRAND, A.; 1995: Correlations entre les amines biogènes et d'autres constituants du vin. 5^{ème} Symp. Intern. d'Enologie, Bordeaux, 665-669.
- T5-USSEAU, D.; 1995: Limite de détection - limite de quantification. Feuilles verts (F.V.) 1000, O.I.V., Paris.
- VASCONCELOS, A. M. P.; CHAVES DAS NEVES, H. J.; 1990: HRGC of wine free amino acids as a tool for elementary wine characterization. J. High Resolut. Chromatogr. **13**, 494-498.
- YOKOTSUKA, K.; KATO, I.; OGBONNA, J. C.; AMANO, Y.; 1989: An automated method for fluorimetric measurement of proline in grapes and wines. Ferment. Bioengin. **68** (3), 222-224.

Reçu le 3 Novembre 1997