

Análisis de Aniones, Ácidos Orgánicos, y Cationes en Vino por Electroforesis Capilar

John C. Hudson and Mark Lies, Global Tactical Marketing,
Beckman Coulter Life Sciences Brea, CA, USA

INTRODUCCIÓN

La tecnología de electroforesis capilar (CE) ha estado disponible comercialmente como tecnología de separación durante más de 20 años. Los beneficios clave de esta tecnología incluyen su capacidad de proporcionar separaciones cuantitativas de alta resolución, para analitos cargados utilizando una plataforma automatizada. Los ejemplos de áreas en las que se utiliza (CE) incluyen, Caracterización de pureza y heterogeneidad bioterapéutica, análisis de glucano, control de bioprocesos en los que se emplea el análisis de iones. Dado que un principio fundamental para la separación con CE es la separación altamente eficiente de analitos cargados o polares, es posible expandirse fácilmente a otras áreas a las que Beckman Coulter brinda soporte en servicio y aplicaciones.

La tecnología CE puede ser empleada fácilmente en áreas de la industria de alimentos y bebidas. Como un ejemplo la producción de vino puede ser monitoreada para sus requerimientos de consistencia y seguridad. La producción de vino representa un importante negocio global, con Italia, Francia y España a la cabeza en volumen de producción¹. En Los Estados Unidos se estimó que el consumo de vino generó más de \$ 32 mil millones en ingresos, lo que equivale a aproximadamente 347 millones de cajas de vino en 2010². Para proporcionar consistencia al producto, las pruebas de vino se realizan por una variedad de razones, incluyendo control de calidad, análisis de certificación y denominación, y adulteración. A medida que esta industria continúa experimentando un crecimiento en los ingresos y la demanda, nuevos productores de uva y productores de vino están ingresando al mercado. En algunos casos, los oportunistas amenazan la tergiversación de marca o incluso la adulteración. Por todas estas razones, es imprescindible proporcionar herramientas para pruebas de alta calidad de productos vitivinícolas.

Gran parte del carácter de un vino se remonta a las variedades específicas de la uva, su entorno geográfico y en última instancia a la elaboración del vino. Entre las cualidades críticas que caracterizan a los vinos se encuentran la presencia y concentración de numerosas entidades moleculares, incluidos aniones, cationes, ácidos orgánicos, glutatión,

sulfitos, lisosomas l color, equilibrio y al sabor de un vino y compuestos fenólicos, de los cuales todos pueden ser analizados utilizando la tecnología CE debido a su naturaleza con carga o polar. Funcionalmente, los iones y los ácidos orgánicos proporcionan especificidad al color, el equilibrio y al sabor de un vino y también pueden conferir estabilidad microbiológica y fisicoquímica³. El Glutatión, un antioxidante, se cree que proporciona estabilidad para el aroma de un vino y los ácidos fenólicos presentes en el vino son responsables características como el sabor, el color y la sensación en la boca. Los sulfitos, que pueden existir naturalmente y también pueden complementarse ayudan a inhibir el crecimiento microbiano³. Por lo tanto, un análisis cuantitativo y cualitativo, preciso de estas moléculas es importante para una comprensión integral de cómo conservar la calidad y el carácter del vino.

En este trabajo, nos propusimos a demostrar la aplicación práctica de la tecnología de electroforesis capilar para el análisis de iones en varias muestras comerciales de vino. Nos centramos principalmente en la generación de perfiles de aniones, ácidos orgánicos y cationes, para ilustrar la simplicidad de la técnica, así como su capacidad para realizar separaciones de alta resolución de forma rápida y reproducible.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

Estándares

Se obtuvieron los siguientes estándares: ácido glucónico de grado reactivo como calcio-D-gluconato, ácido l-láctico y ácido l-málico (Alfa Aesar); El ácido cítrico, el ácido oxálico como oxalato de sodio, el sulfato de sodio, el sulfito de sodio y el ácido tartárico fueron de grado reactivo (Fisher Scientific). Otros ácidos y aniones orgánicos utilizados como patrones fueron componentes de los kits Beckman Coulter descritos a continuación.

Reactivos

Se usó agua destilada y desionizada (DDI) donde fue necesario. Las soluciones de enjuague grado reactivo, de metanol, hidróxido de sodio 1 N y ácido clorhídrico 0,1 N (VWR Scientific, Bridgeport, NJ, EE. UU.).

El kit de análisis de aniones (Parte No. A53537) y el Kit de análisis de cationes (Parte No. A53540) (ambos de Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EUA) se usaron para separaciones de aniones y cationes.

Instrumentación

Las separaciones se realizaron usando el sistema de análisis farmacéutico PA 800 plus equipado con un detector UV configurado para usar con un filtro de 230 nm para el kit de análisis de aniones o un filtro de 200 nm para usar con el kit de análisis de cationes. La detección UV en el modo indirecto en el cual los compuestos de interés causan un cambio en la constante absorbancia UV presente de un compuesto agregado al tampón.

El PA 800 plus se controló utilizando el software 32 Karat v9.1. Las temperaturas de almacenamiento capilar y de muestra se ajustaron a 25°C y 10°C, respectivamente. La velocidad de recopilación de datos del detector se estableció en 4 Hz. El filtro del detector se ajustó a normal y los puntos de ancho de pico del filtro se ajustaron a 16-25. Estos ajustes se utilizaron para todos los métodos descritos en este trabajo, incluidos el equilibrio, la separación y el apagado. Estas configuraciones se describen en detalle en las Guías del usuario disponibles para cada kit.

Capilar

Los capilares de sílice fundida suministrados en los kits de análisis de aniones y análisis de cationes tenían 75 µm i.d., 375 µm o.d y se recortaron para dar una longitud total de 60,2 cm y una longitud efectiva de 50 cm. Para el análisis de aniones, los capilares fusionados se recubren dinámicamente antes de cada ejecución, lo que da como resultado una superficie cargada positivamente. Para el análisis de cationes, el procedimiento de recubrimiento da como resultado una superficie negativa en un procedimiento de recubrimiento doble. En ambos kits, las superficies capilares se regeneran antes de cada ejecución, lo que da como resultado un flujo electroosmótico constante y tiempos de migración altamente precisos.

Antes del primer uso, los nuevos capilares se acondicionaron enjuagando con la solución acondicionadora-Na provista durante 1 minuto. Espere 4 minutos antes de repetir este enjuague durante 30 segundos. La solución de enjuague se aplicó luego durante 1 minuto. Todos los enjuagues se realizan con 20 psi. El acondicionamiento se repitió si los tiempos de migración y la forma del pico no estaban dentro de las especificaciones descritas en el Manual del usuario para cada kit.

Antes de la evaluación del desempeño del Sistema o análisis

de muestra, los capilares deben ser acondicionados. Se deben realizar dos repeticiones del estándar de desempeño para garantizar una buena reproducibilidad de los tiempos de migración y las áreas corregidas a lo largo de la secuencia.

Métodos de Separación

Los métodos de separación de aniones y cationes, junto con los métodos de apagado para ambos kits, se programaron y aplicaron como se describe en los respectivos manuales del kit.

Almacenamiento del Capilar

Antes de retirar el capilar de separación del instrumento para el almacenamiento, enjuague el capilar con solución de enjuague durante 5 minutos a 20 psi. Guarde el capilar en su caja de almacenamiento con los extremos del capilar sumergidos en la solución de enjuague en viales universales tapados. No permita que los extremos se sequen, ya que el capilar puede obstruirse. Almacene el capilar a 2-8°C y cambie la solución de enjuague semanalmente.

Preparación de las Muestras

Se requiere una mínima preparación de la muestra para la separación CE y se puede hacer por simple dilución del vino a analizar. A menos que las partículas sean visibles, no es necesario filtrar o centrifugar las muestras. Un buen punto de partida es diluir el vino 1 en 25. Esto se puede hacer agregando 0.2 ml de vino a un volumétrico de 5 ml y llevarlo al volumen con una dilución 1 a 1 con agua de la solución de solución Acondicionador-Na para el análisis de aniones. proporcionado en el kit de análisis de aniones. Si la muestra está demasiado diluida o se requiere la detección y cuantificación de componentes menores, simplemente diluya la muestra 1 en 10 o 1 en 5. En los casos en que el volumen de la muestra es limitado, existen opciones de micro-muestreo que requieren menos de 100 microlitros de muestra diluida.

Técnica de Inyección

Las inyecciones hidrodinámicas (de presión) se utilizan en los métodos descritos. La inyección electrocinética (voltaje) puede usarse como una técnica de preconcentración para aumentar la carga y la resolución de los analitos. La inyección de voltaje también actúa como un procedimiento de limpieza, ya que inyecta solo analitos cargados de interés. La inyección de voltaje también puede proporcionar un límite de detección (LOD) hasta el nivel de partes por mil millones (ppb). Cuando se usan estos métodos para la cuantificación, es necesario el uso de un estándar interno para compensar cualquier sesgo resultante de la inyección de voltaje para los iones de diferentes movilidades. En el kit de aniones, el octanato se utiliza como estándar interno. Para el Kit de cationes, el litio actúa como el estándar interno.

Capacidad de Desempeño de muestra

Sin una mayor optimización de los métodos descritos en el manual del usuario tanto para el kit de aniones como para el de cationes, se pueden realizar ensayos de 130 aniones o 160 cationes en un período de 24 horas utilizando una bandeja de 96 posiciones de pocillos profundos. Si se utiliza la bandeja de 48 posiciones, será necesario reponer las muestras una vez que se complete el primer conjunto de muestras. Puede haber espacio adicional disponible en la bandeja del tampón de entrada desde el cual también se pueden inyectar muestras si se desea (las muestras almacenadas en la bandeja del tampón de entrada no se pueden controlar con la temperatura).

Nota: Las Guías del usuario mencionadas en esta documentación fueron escritas para el sistema de electroforesis capilar P / ACE MDQ. Para la aplicación en el PA 800 plus, serán necesarias modificaciones menores en la preparación de muestras

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nos propusimos analizar los vinos comerciales en busca de diferencias en el contenido general de aniones, ácidos orgánicos y cationes. Se compraron varios vinos tintos y blancos, se diluyeron y se separaron utilizando los protocolos definidos en los kits de aniones y cationes Beckman Coulter. Para establecer el rendimiento de la prueba de referencia para el análisis de muestras de vino, se preparó y se separaron los estándares de rendimiento para identificar de manera confiable cada uno de los iones y ácidos orgánicos (Figura 1A, 1B y 1C). Los estándares de aniones separados rutinariamente resultaron en $\leq 0.2\%$ RSD para el tiempo de migración y en $\leq 3.7\%$ RSD para el área corregida. La separación de los estándares de cationes resultó en $\leq 0.06\%$ RSD para el tiempo de migración y en $\leq 2.9\%$ RSD para el área corregida.

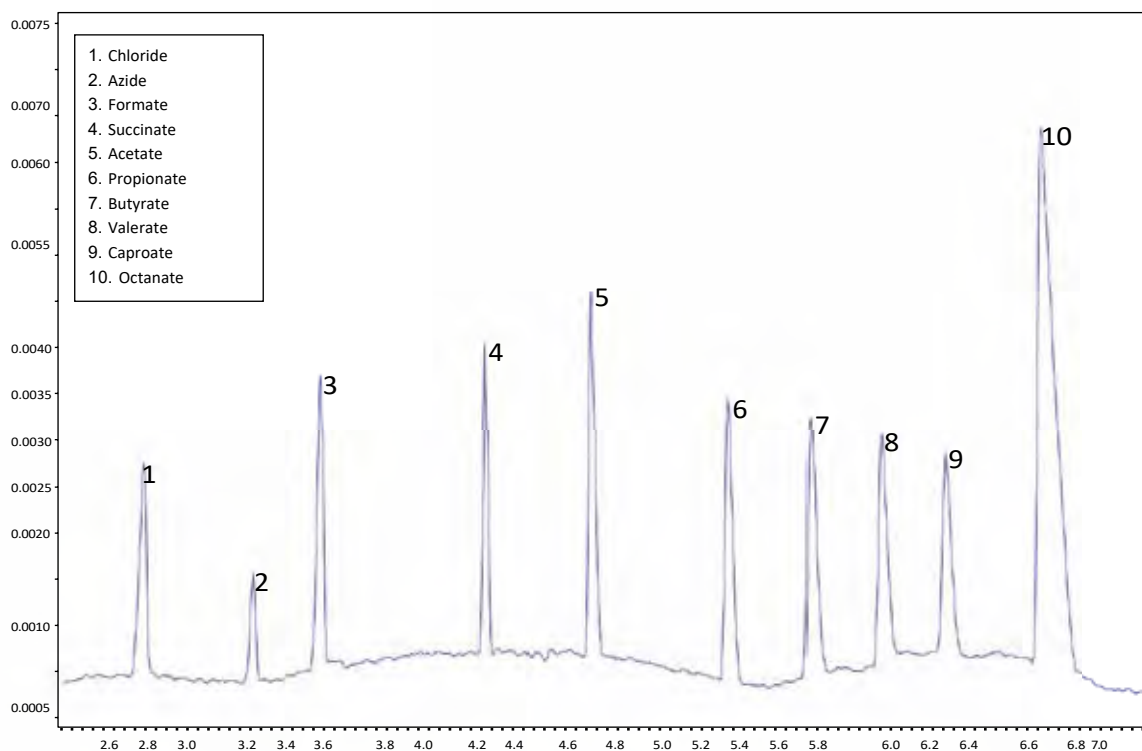


Figura 1A. Mezcla de prueba orgánica aniónica. 20 ppm cada uno, azida 10 ppm

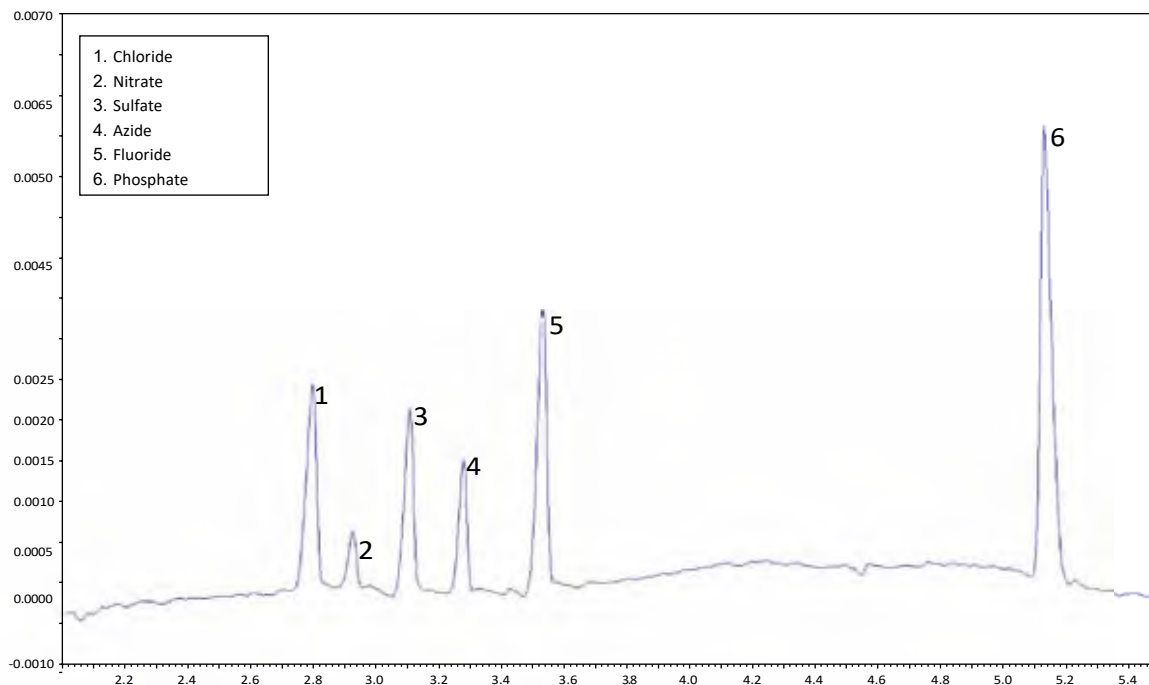


Figura 1B. . Mezcla de prueba inorgánica de aniones 20 ppm cada una, azida, fluoruro 10 ppm.

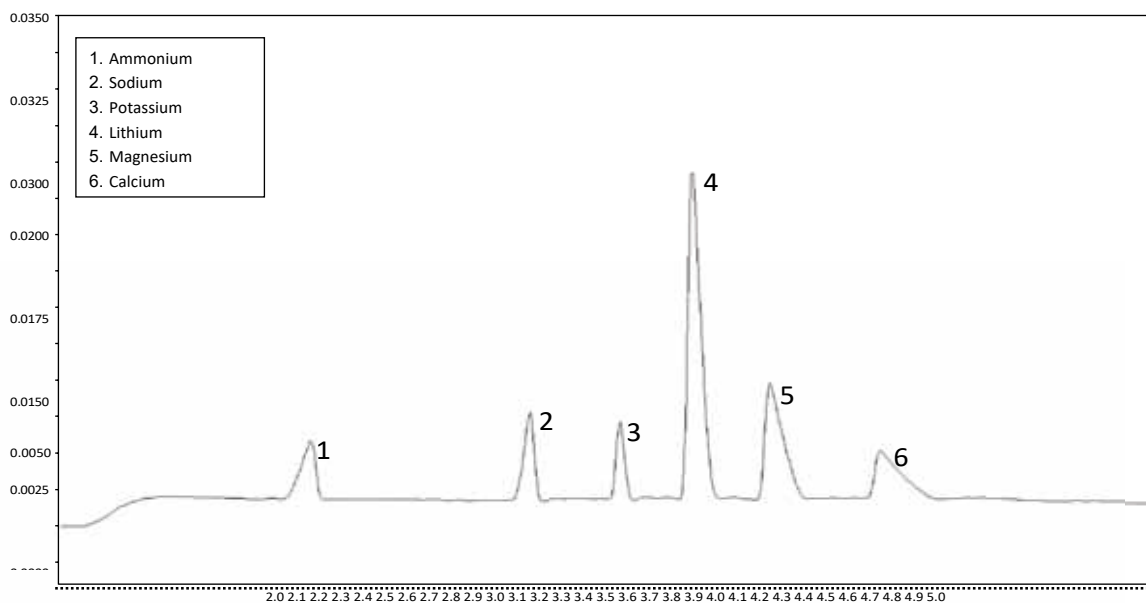


Figura 1C. Mezcla de prueba de cationes 20 ppm para cada componente

Una dilución simple y la separación de un vino blanco (Chardonnay) usando la química del análisis de aniones resultó en un perfil de alta resolución donde pudimos identificar en menos de 8 minutos, 14 especies de iones orgánicos e inorgánicos presentes en la muestra (Figura 2).

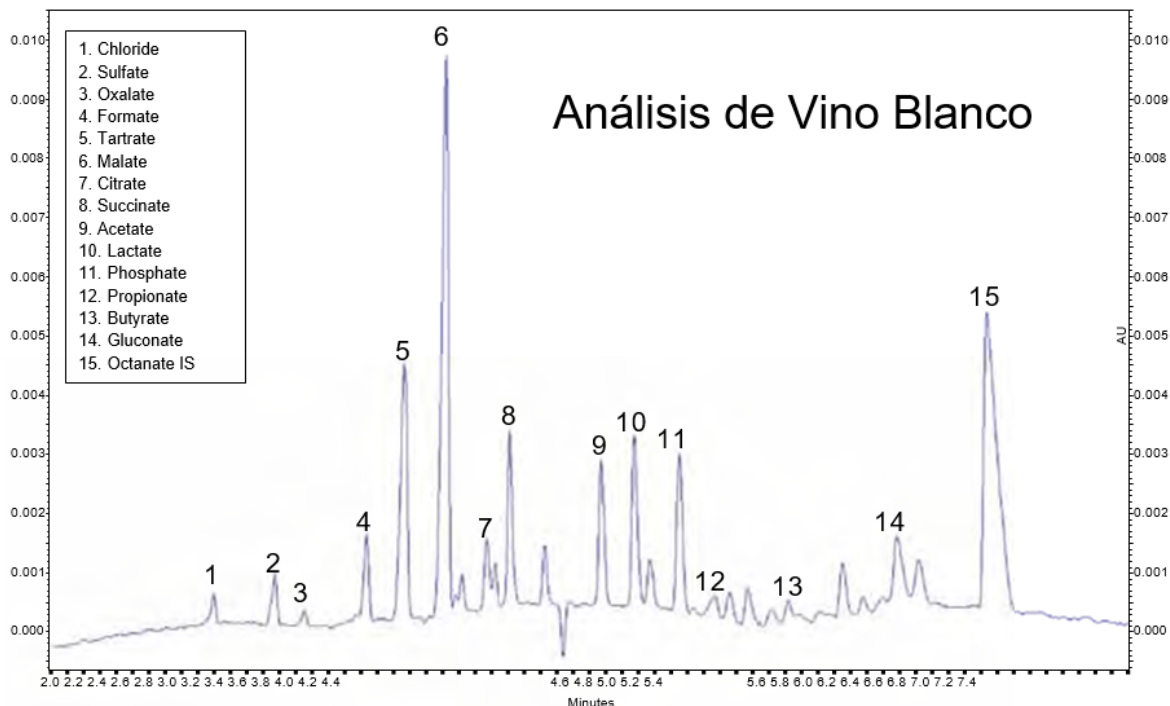


Figure 2: Anion profile of white wine – Chardonnay, Lindeman's Bin 65, SE Australia 2011.

Se realizó una separación similar utilizando una muestra de vino tinto (Figura 3). La comparación de las dos separaciones realizadas indicó una diferencia importante en los vinos blancos y tintos evaluados como la concentración del ácido málico y ácido succínico, el primero más abundante en el vino blanco y el segundo más abundante en el vino tinto.

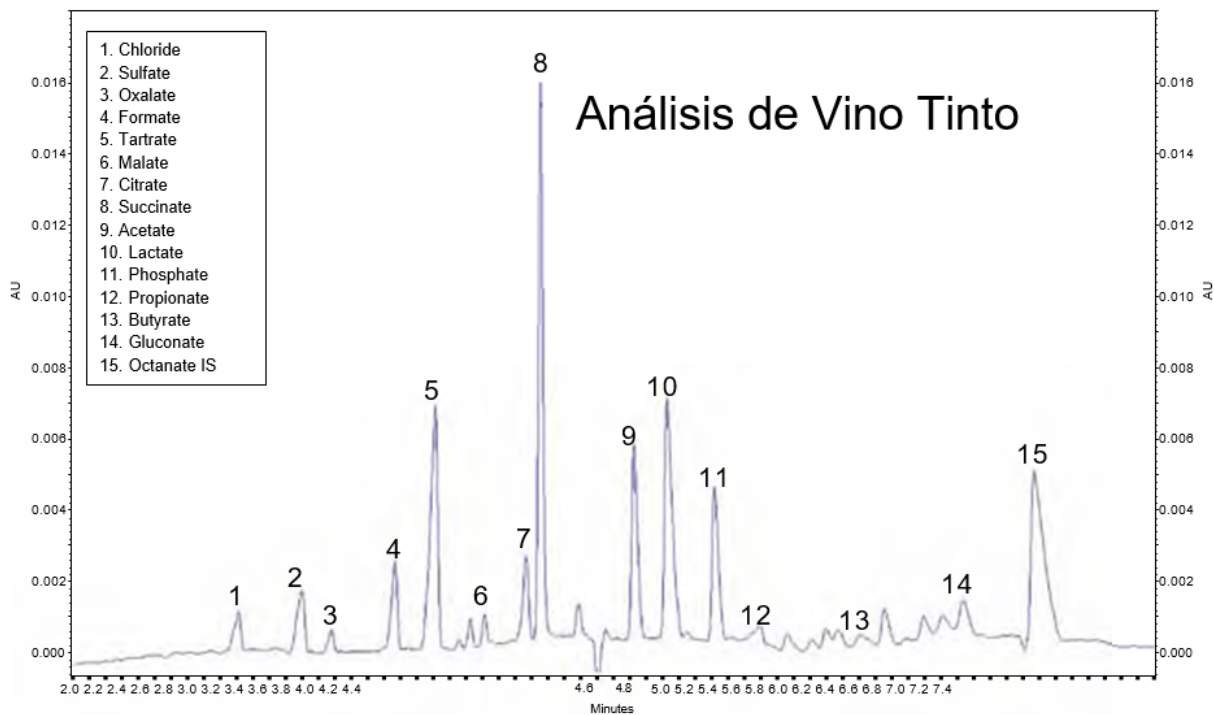


Figura 3: Perfil de aniones del vino tinto - Cabernet Sauvignon, Wyndham Bin 444, SE

Para demostrar la repetibilidad del ensayo, se realizaron múltiples separaciones de aniones y se superpusieron mostrando una excelente reproducibilidad tanto para el tiempo de migración como para el área corregida (Figuras 4 y 5).

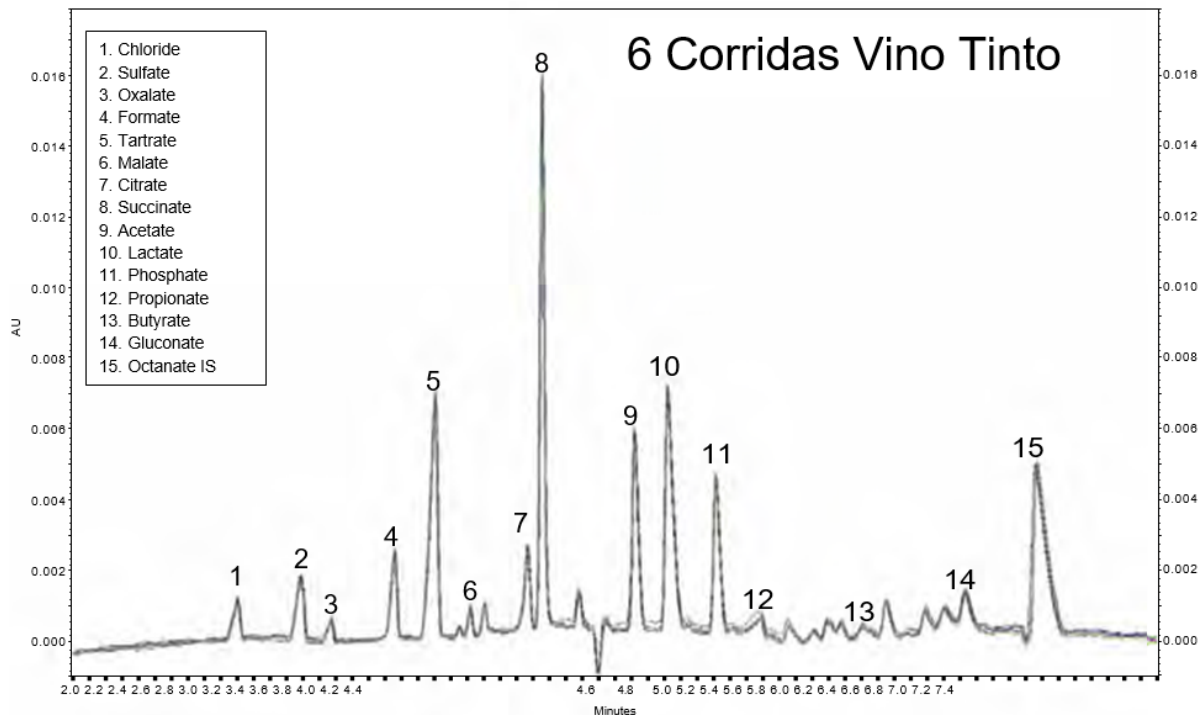


Figura 4A: Repetibilidad de separación para aniones y ácidos orgánicos en vino tinto. Superposición de 6 electroferogramas de separación de aniones de vino tinto.

Red Wine #1 - 6 Reps						Red Wine #1 - 6 Reps					
Migration Time						Corrected Area					
Run	Tartrate	Citrate	Succinate	Acetate	Lactate	Run	Tartrate	Citrate	Succinate	Acetate	Lactate
1	3.842	4.304	4.379	4.850	5.017	1	3882	824	4654	1992	3053
2	3.842	4.304	4.379	4.846	5.017	2	3844	814	4688	1986	3036
3	3.842	4.304	4.379	4.846	5.017	3	3855	828	4783	2026	3057
4	3.842	4.304	4.375	4.846	5.017	4	3839	837	4721	2037	3065
5	3.837	4.300	4.375	4.842	5.013	5	3869	818	4698	2075	3076
6	3.837	4.300	4.375	4.842	5.013	6	3871	834	4731	2039	3130
AV	3.840	4.303	4.377	4.845	5.016	AV	3860	826	4713	2026	3070
STDEV.S	0.003	0.002	0.002	0.003	0.002	STDEV.S	16.8	9.0	43.9	33.0	32.5
%RSD	0.067	0.048	0.050	0.062	0.041	%RSD	0.435	1.084	0.931	1.629	1.058

Figura 4B: Repetibilidad de separación para ácidos orgánicos en vino tinto. Los datos para las 6 separaciones de aniones de vino tinto que se muestran en la Figura 4A.

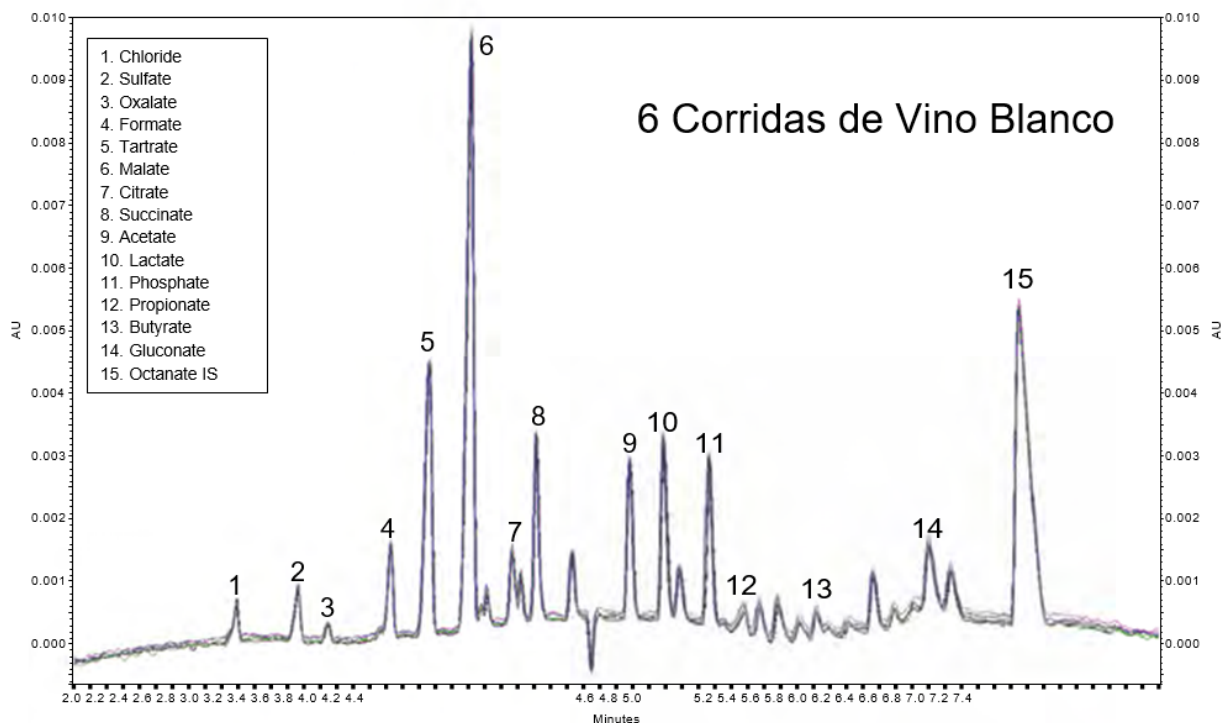


Figura 5A: Repetibilidad de separación para ácidos orgánicos en vino blanco. Superposición 6 electroferogramas de la separación de aniones de vino blanco.

White Wine #1 - 6 Reps		Migration Time				
Run	Tartrate	Citrate	Succinate	Acetate	Lactate	
1	3.800	4.013	4.338	4.808	4.975	
2	3.804	4.017	4.342	4.813	4.983	
3	3.804	4.017	4.342	4.813	4.983	
4	3.804	4.017	4.346	4.813	4.983	
5	3.804	4.017	4.346	4.813	4.983	
6	3.804	4.021	4.346	4.817	4.987	
AV	3.803	4.017	4.343	4.813	4.982	
STDEV.S	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	
%RSD	0.043	0.063	0.075	0.059	0.079	

White Wine #1 - 6 Reps		Migration Time				
Run	Tartrate	Citrate	Succinate	Acetate	Lactate	
1	2127	4658	937	744	975	
2	2129	4711	953	765	1001	
3	2126	4733	969	772	981	
4	2150	4743	964	792	982	
5	2138	4772	957	794	993	
6	2157	4742	985	784	1004	
AV	2138	4727	961	775	989	
STDEV.S	13.0	38.9	16.2	19.0	11.8	
%RSD	0.610	0.823	1.681	2.448	1.190	

Figura 5B: Repetibilidad de separación del tiempo de migración y área corregida para ácidos orgánicos en vino blanco. Los datos para las 6 separaciones de aniones de vino blanco que se muestran en la Figura 5A.

En este estudio, analizamos el contenido de cationes para estas mismas muestras comerciales de vino. No encontramos diferencias significativas en las poblaciones de cationes entre las variedades rojas y blancas en estos experimentos (Figura 6A). También logramos una muy buena repetibilidad del ensayo (Figura 6B y 6C).

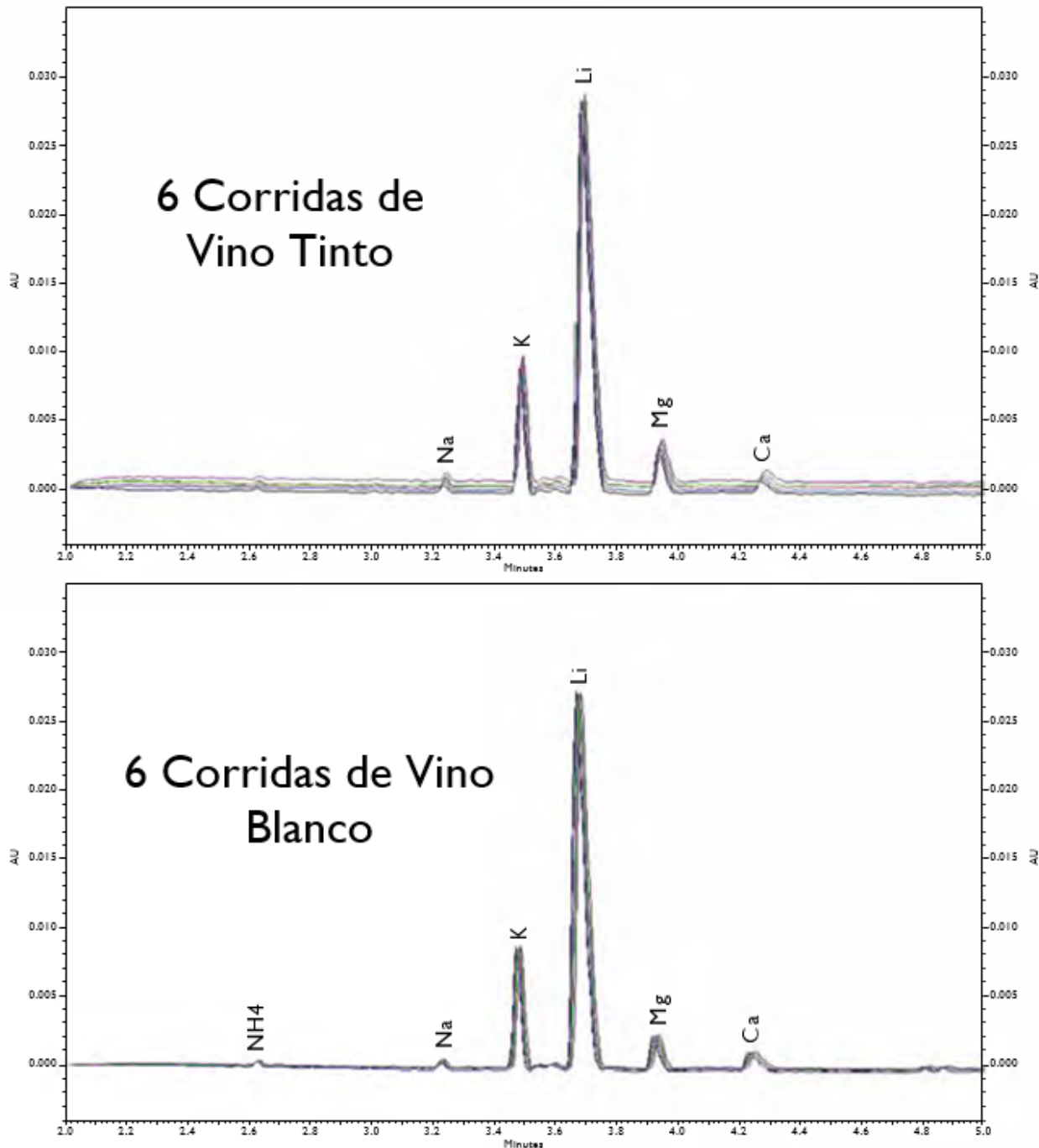


Figura 6A: Repetibilidad de separación para cationes presentes en muestras de vino tinto y blanco. Superposición de 6 electroferogramas de la separación de cationes de vino tinto o 6 de vino blanco (NH4 no cuantificado).

Red Wine #1 - 6 Reps		Migration Time			
	Na	K	Li	Mg	Ca
Run					
1	3.233	3.483	3.679	3.933	4.267
2	3.237	3.483	3.683	3.938	4.271
3	3.237	3.483	3.683	3.938	4.271
4	3.242	3.492	3.688	3.942	4.279
5	3.242	3.492	3.688	3.942	4.279
6	3.242	3.496	3.692	3.946	4.279
AV	3.239	3.488	3.686	3.940	4.274
STDEV.S	0.004	0.006	0.005	0.004	0.005
% RSD	0.116	0.168	0.127	0.114	0.124

Red Wine #1 - 6 Reps		Corrected Area			
	Na	K	Li	Mg	Ca
Run					
1	236	3769	17300	1431	367
2	227	3768	17180	1444	363
3	227	3768	17180	1444	363
4	206	3741	17141	1487	407
5	204	3737	17123	1426	373
6	191	3743	17029	1429	395
AV	215	3754	17159	1444	378
STDEV.S	17.4	15.5	88.6	22.7	18.6
% RSD	8.068	0.412	0.517	1.569	4.915

White Wine #1 - 6 Reps		Migration Time			
	Na	K	Li	Mg	Ca
Run					
1	3.221	3.467	3.663	3.917	4.225
2	3.225	3.471	3.667	3.921	4.229
3	3.225	3.487	3.671	3.925	4.233
4	3.229	3.475	3.671	3.929	4.237
5	3.229	3.479	3.675	3.933	4.242
6	3.242	3.496	3.692	3.946	4.279
AV	3.233	3.483	3.679	3.938	4.25
STDEV.S	0.007	0.046	0.010	0.010	0.020
% RSD	0.225	1.314	0.274	0.261	0.462

White Wine #1 - 6 Reps		Corrected Area			
	Na	K	Li	Mg	Ca
Run					
1	225	3508	16415	996	643
2	215	3441	16141	997	650
3	220	3452	16138	999	634
4	214	3471	16166	986	640
5	213	3440	16048	1006	656
6	213	3442	16180	998	655
AV	217	3459	16181	997	646
STDEV.S	4.8	26.7	123.4	6.4	8.8
% RSD	2.236	0.772	0.763	0.647	1.358

Figura 6C: Repetibilidad de separación para cationes presentes en las muestras de vino blanco. Los datos para las 6 separaciones de cationes de vino blanco que se muestran en la Figura 6A.

Ampliamos nuestro análisis para incluir una selección de vinos blancos y tintos comerciales de diferentes regiones del mundo para determinar las diferencias entre cada tipo. Aunque hubo algunas diferencias cuantitativas, el contenido general de aniones y ácidos orgánicos fue similar entre los diversos vinos blancos y los tintos (Figura 7).

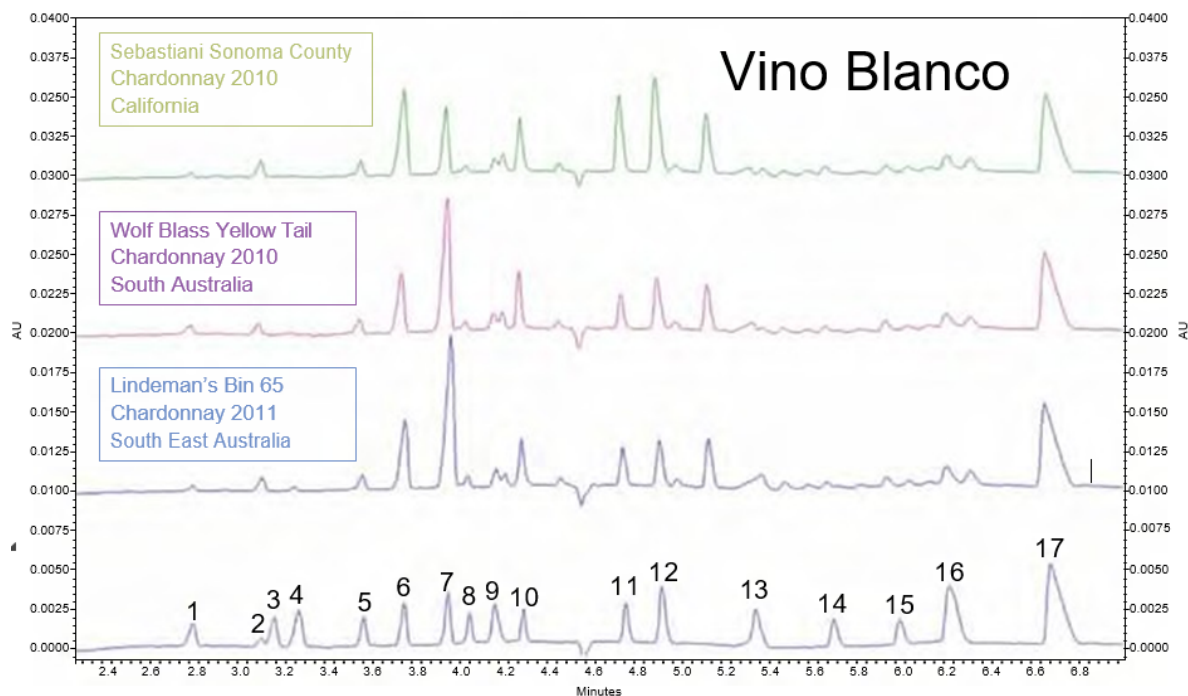


Figura 7A: Perfiles de separación de aniones y ácidos orgánicos para tres vinos blancos. Las muestras de 3 vinos blancos comerciales se diluyeron y se separaron usando el kit químico de Aniones. Los vinos analizados fueron: California Chardonnay (2010), South Australia Chardonnay (2010) y Southeast Australia Chardonnay (2011). La gráfica inferior representa la separación de la mezcla de patrones prueba. Leyenda: 1. Cloruro 2. Sulfato 3. Clorato 4. Oxalato 5. Formato 6. Tartrato 7. Malato 8. Sulfito 9. Citrato 10. Succinato 11. Acetato 12. Lactato 13. Propionato 14. Butirato 15. Valerato 16. Gluconato 17. Estándar Interno de Octanoato.

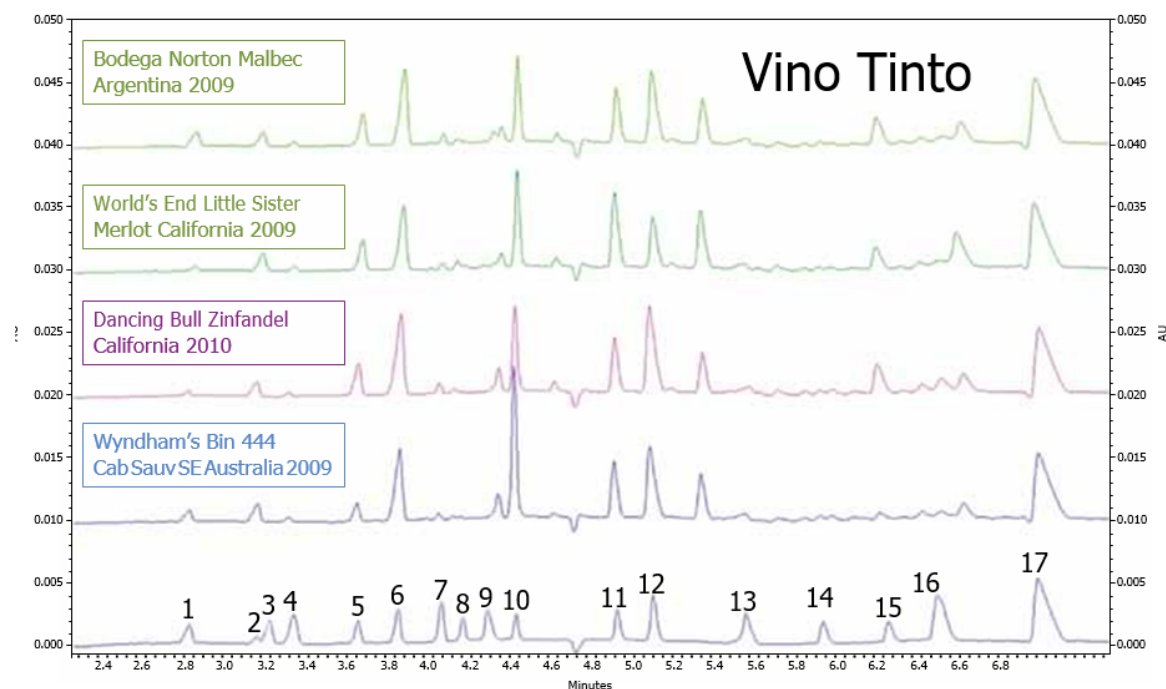


Figura 7B: Perfiles de separación de aniones y ácidos orgánicos para cuatro vinos tintos. Las muestras de 4 vinos tintos se diluyeron y se separaron usando el kit químico de Aniones. Los vinos analizados fueron: Argentina Malbec (2009), California Merlot (2009), California Zinfandel (2010) y Australia Cabernet Sauvignon (2009). La gráfica inferior representa la separación de la mezcla de patrones prueba. Leyenda: 1. Cloruro 2. Sulfato 3. Clorato 4. Oxalato 5. Formato 6. Tartrato 7. Malato 8. Sulfito 9. Citrato 10. Succinato 11. Acetato 12. Lactato 13. Propionato 14. Butirato 15. Valerato 16. Gluconato 17. Estándar Interno de octanoato.

RESUMEN Y CONCLUSIÓN

La electroforesis capilar se usa ampliamente en muchas industrias para ayudar a asegurar que los procesos de producción sean consistentes y que cumplan con las consideraciones regulatorias apropiadamente. Como ejemplo, la fabricación de vino requiere procedimientos de control de calidad para evaluar tanto la producción como el producto final. En ciertas regiones del mundo, existen regulaciones que definen la acidez permitida en los vinos comerciales. Esta acidez se puede probar en parte caracterizando la presencia y la cantidad de analitos clave, incluidos los ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico, acético y láctico. Una de estas pruebas analíticas relacionadas con el vino donde se puede aplicar CE es en la caracterización de aniones, cationes y ácidos orgánicos comúnmente presentes. El trabajo descrito aquí ilustra la utilidad de la CE, específicamente el análisis químico de iones, en el análisis de vinos comerciales. Como proporciona un medio para lograr fácilmente una separación de iones reproducible, rápida y de alta resolución con una preparación mínima de la muestra, la tecnología CE ofrece una estrategia automatizada para caracterizar mejor los iones y ácidos orgánicos en el vino con el potencial de separar eficientemente otras moléculas cargadas o polares que pueden también estar presente.

REFERENCIAS

1. XXXIV World Congress of Vine and Wine and the 9th General Assembly of OIV – 2011 Proceedings www.oiv2011.pt/en/en_organisation.html
2. Wine Institute online information www.wineinstitute.org/resources/pressroom/03222012
3. Ribereau-Gayon, P., Gloris, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. 2000. Handbook of Enology, The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments. Vol. 2. Wiley. New York

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11666-ES-A



Headquarters

500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales

For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices