

Document annexe

Analyse de métabolites hydrosolubles de la vigne après dérivatisation MeOx-MSTFA

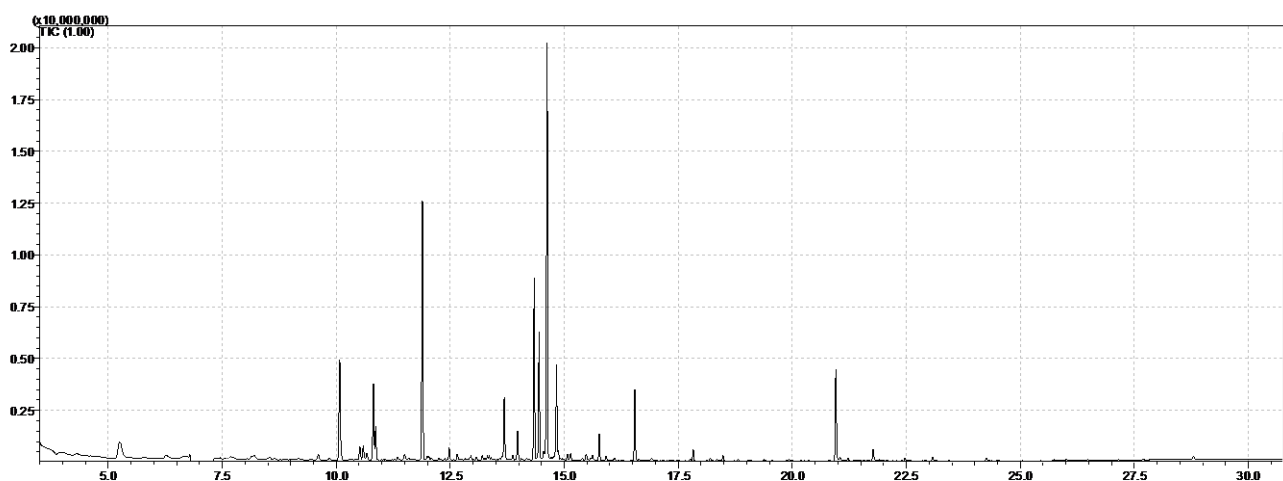
Dans ce document annexe, vous trouverez le mode opératoire utilisé au laboratoire sur le système actuel pour l'analyse des métabolites hydrosolubles de la vigne après dérivatisation MeOx-MSTFA.

Préparation des échantillons : Les échantillons de racines de vigne ont été préalablement désécorcés, broyés, lyophilisés, extraits 2 fois avec une solution aqueuse tamponnée (tampon phosphate à 50 mM, pH 6.0 ajusté avec du NaOH 1M et contenant 25 µg/mL d'acide phénoxyacétique comme standard interne) pour extraire notamment les métabolites primaires tels que les sucres, très abondants, acides aminés et petits acides organiques et filtrés à 0.2 µm. 10 µL des extraits sont lyophilisés pour obtenir les échantillons qui vous sont fournis.

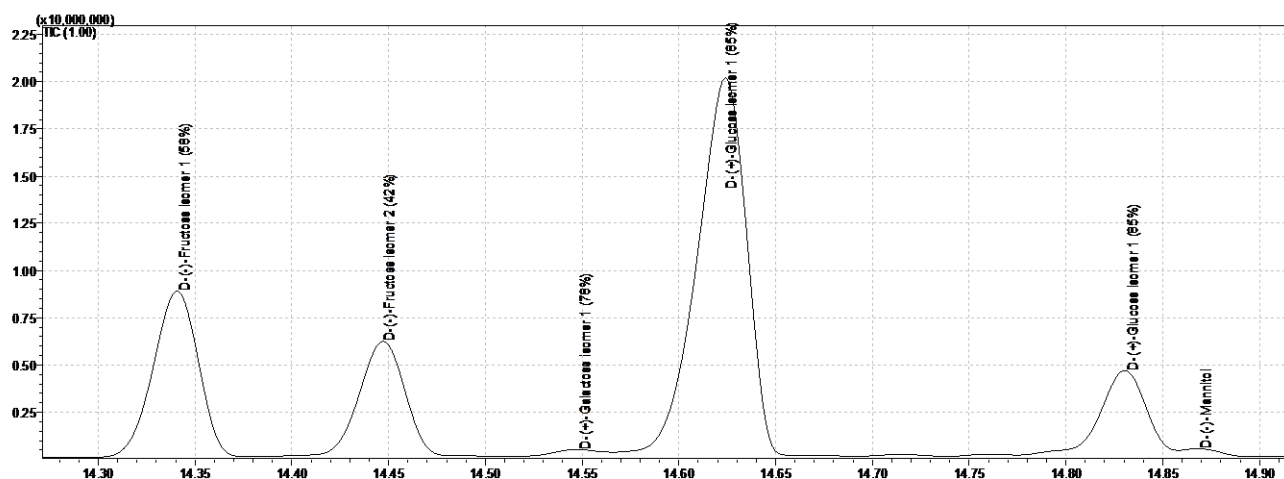
Dérivatisation : 10 µL d'une solution de chlorhydrate de méthoxyamine à 30 mg/mL dans de la pyridine anhydre ont été ajoutés dans chaque vial placé sous agitation à 600 rpm et 37°C pendant 120 min. 40 µL de n-méthyl-n-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA) ont été ajoutés et les échantillons ont été incubés pendant 30 minutes supplémentaires à 37 °C et 600 rpm avant d'être injectés.

Méthode d'analyse : le système analytique actuellement utilisé est constitué d'un système de chromatographie gazeuse couplé à un spectromètre de masse disposant d'une source de type impact électronique et d'un analyseur quadripôle. Une colonne BPX5 (phase 95 % diméthylpolysiloxane 5% phényle) longueur 25 m, diamètre intérieur 0,15 mm, épaisseur film 0,25 µm est utilisée. Le volume d'injection des échantillons de 1 µL (mode splitless). La température de l'injecteur est de 310°C. Le débit du gaz vecteur (Hélium) est de 0,73 mL/min et nous travaillons à vitesse constante. Le gradient de température appliqué est le suivant : 110°C pendant 4min – montée à 10°C/min jusqu'à 350°C - reste à 350°C pendant 3 min (temps total d'analyse 31 min). La ligne de transfert est à 330 °C et la source d'ions à 200 °C. Une coupure du filament est appliquée entre 6,80 et 7,30 min (pic du phosphate très abondant).

Résultats :



Chromatogramme complet



Zoom sur le glucose et galactose

Mettre les temps de rétention des isomères et les chromato

Métabolite	Tr (min)	KI	Fragments principaux
D-(+)-Glucose, 1MeOx 5TMS isomère maj	14.795	1853	319(37) 205(33) 160(22) 103(14) 217(13) 129(8) 117(7) 133(5)
D-(+)-Glucose, 1MeOx 5TMS isomère min	15.012	1873	319(29) 205(27) 103(20) 160(16) 217(12) 129(7) 133(7) 117(6)
D-(+)-Galactose, 1MeOx 5TMS isomère maj	14.734	1847	205(34) 319(34) 217(17) 160(14) 103(14) 117(12) 129(10)
D-(+)- Galactose, 1MeOx 5TMS isomère min	14.986	1871	205(32) 319(29) 103(20) 217(19) 160(9) 129(8) 117(7)
Acide phénoxyacétique (standard interne)	9.74	1441	135(20) 165(18) 224(16)

- Le glucose et galactose sont soluble dans l'eau ou dans un tampon phosphate.
- La gamme de calibration actuellement utilisée pour le glucose et le galactose sur notre appareillage s'étend de 0.5 à 25 µM