

APPLICATION NOTE

# 使用 SpectraMax Plus 384 微孔板读板机 测量红酒中的酚类化合物

## 介绍

红酒中单宁，铁反应性酚类，花青素和聚合物色素的测定是葡萄酒行业质量控制的重要组成部分。准确、可靠地测量葡萄酒中的酚类化合物对于发酵，浸渍，压榨和混合过程中的决策至关重要。Harbertson 等人于 2003 年开发了一种全面的红酒酚类测定法 (1)。传统上，该测定法是使用基于比色皿的紫外可见分光光度计进行的。读取单个比色皿中的单个样品，记录结果并分析数据是一个耗时且费力的过程。Heredia 等人认为需要一种快速、经济有效的检测方法，因此将该检测方法应用于微孔板平台。这种方法增加了有关人工，时间和样品量的通量，扩大了中等规模酒厂中监测酚类化合物提取发酵过程的能力。在这里，我们描述了使用 Molecular Devices 公司的 SpectraMax®Plus 384 微孔板读板机和 SoftMax®Pro 软件来有效收集和分析此测定的数据。

SpectraMax Plus 384 微孔板读板机的一些独特功能包括：

- 波长范围：190–1000 nm，以 1 nm 为增量
- 基于双单色器的光学元件使其无需使用滤光片 (图 1)
- 读取速度：96 孔：5 秒  
384 孔：16 秒
- 温度：比环境温度高 4 °C 至 45 °C
- 比色皿插槽：可容纳标准比色皿和 12 x 75 mm 试管
- OD 范围：0–4 OD

## 红酒酚含量测定

Adams / Harbertson 测定法使用分光光度法、蛋白质沉淀法和亚硫酸氢盐漂白技术来测量红酒中的酚类。

## PathCheck 传感器

PathCheck® 传感器是 Molecular Devices 的一项专利<sup>[1]</sup>功能，可以测量微孔板中样品的光程。这是将微孔板中的吸光度读数标准化为 1 厘米比色皿的创新方法。

Beer-Lambert 定律指出吸光度 =  $E * C * L$   
其中

$E$  = 吸收率 (消光系数)

$C$  = 浓度

$L$  = 光程

在比色皿的情况下，光路是水平的。因此，光程是固定的，等于 1 cm。但是在微孔板的情况下，光路是垂直的。因此，光程长短取决于样品的体积 (图 2)。PathCheck 传感器会纠正差异。

## SoftMax Pro 软件

该软件控制仪器，收集数据并提供完整的数据分析。带有适当的仪器设置和计算方法的定制化模板可以预先编写并保存。最终用户可以方便地打开预先设置的模板，获得完整的结果和分析，而无需重新花费时间设置模板。

## 优势

- 与传统的比色皿方法相比，提高了通量
- 使用 SoftMax Pro 软件进行自动数据分析
- PathCheck 传感器用于微孔板孔中的吸光度读数的标准化

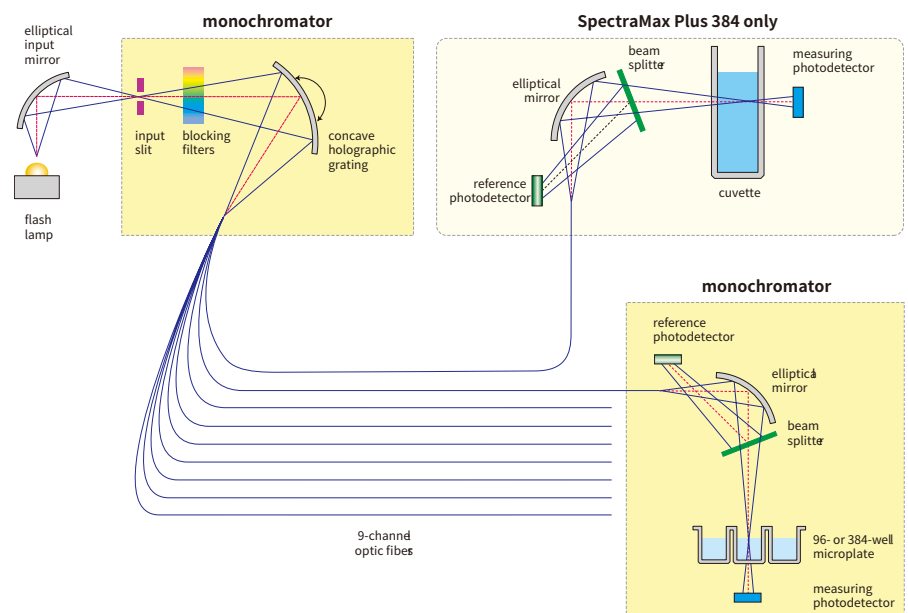


图 1 SpectraMax®Plus 384 光学器件

[1] U.S. Patents 6,496,260 and 6,995,844 (实用新型专利)

## 实验材料

- 葡萄酒样品: Pinot noir (Sonoma Coast)
- 马来酸  
(Fisher Scientific cat. #03417-500)
- 牛血清白蛋白 (Sigma cat. #A3803-10G)
- 三乙醇胺 (Sigma cat.#T1377-100 mL)
- Ferric chloride hexahydrate  
(Sigma cat.#236489-100G)
- (+)-儿茶素 (Sigma cat. #C1251-5G)
- 乙酸 (Sigma cat. #242853-2.5KG)
- 氯化钠 (Fisher Scientific cat. #S271-3)
- 氢氧化钠  
(Fisher Scientific cat. #S318-500)
- 乙醇 (Acros cat. #61509-0040)
- 酒石酸氢钾 (Sigma cat. #243531- 500G)

## 仪器及配件

- SpectraMax Plus 384 微孔板读板机  
(Molecular Devices cat. #PLUS 384)
- 紫外可透 96 孔微孔板  
(Costar cat. #3635)
- 微量移液器  
(Drummond Scientific cat. #2704174, 2705402, 2705412, 2704180; Drummond Digital Microdispenser cat. #3-000-510)
- 微量移液器的微量吸头  
(Eppendorf cat. #epT.I.P.S.; Reloads cat. #022491539, 022491512, 022491547)
- 微量离心管离心机  
(Eppendorf cat. #5424)
- 1.5 mL 微量离心管  
(Eppendorf cat. #022364111, 022363557, 022363514, 2236357-3)

## 实验方法

### 儿茶素标准曲线

在微孔板中进行一系列稀释, 以包括 0-300 mg/L 儿茶素, 每个浓度两个复孔。用缓冲液 C 将最终体积调节至 262  $\mu$ L。将板在振荡器上振荡, 并向每个孔中加入 38  $\mu$ L 氯化铁溶液。将板进行震荡, 进一步孵育 10 分钟, 并在酶标仪中于 510 nm 读取吸光度。缓冲液 C 用作空白。

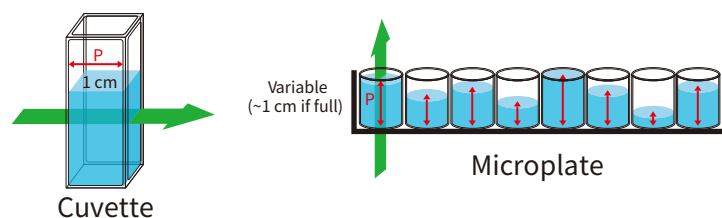


图 2 光程在比色皿和微孔板中是不同的

Solution name/final solution concentration	Reagent and reagent volume ( $\mu$ L, mL) or mass (g, mg)	Final volume (mL) deionized water or buffer	Storage
Buffer A • 200 mM Acetic acid • 170 mM NaCl	• Glacial acetic acid (6.0 mL) • NaCl (4.97 g) • 10% NaOH (adjust to pH 4.9)	Fill to 500 mL DI H <sub>2</sub> O	Room temp.
Buffer B • 12% EtOH (v/v) • 5 g/L Potassium bitartrate	• Potassium bitartrate (2.5 g) • 200 proof ethanol (60 mL) • 2.0 N HCl (adjust to pH 3.3)	Fill to 500 mL DI H <sub>2</sub> O	Room temp.
Buffer C • 5% Triethanolamine (v/v) • 5% SDS (w/v)	• Sodium docecyl sulfate (25 g) • Triethanolamine (25 mL) • 2.0 N HCl (adjust to pH 9.4)	Fill to 500 mL DI H <sub>2</sub> O	Room temp.
Buffer D • 200 mM Maleic acid • 170 mM NaCl	• Maleic acid (11.61 g) • NaCl (4.97 g) • 10% NaOH (adjust to pH 1.8)	Fill to 500 mL DI H <sub>2</sub> O	Room temp.
Ferric chloride • 0.01 N HCl • 10 mM FeCl <sub>3</sub>	• Ferric chloride hexahydrate (0.27 g) • 12.1 N HCl (80 $\mu$ L)	Fill to 100 mL DI H <sub>2</sub> O	Room temp.
Bleaching • 0.36 M K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	• Potassium metabisulfite (0.395 g)	Fill to 5.0 mL DI H <sub>2</sub> O	Prepare as needed
Catechin • 1 mg/mL (+)-Catechin • 10% Ethanol (v/v)	• (+)-Catechin (50 mg) • 200 Proof ethanol (5.0 mL)	Fill to 50 mL DI H <sub>2</sub> O	Freeze (-20 °C)
Protein • 1 mg/mL BSA	• Bovine serum albumin (50 mg)	Fill to 50 mL Buffer A	Prepare as needed

表 1 红酒酚类物质全面检测试剂的制备 (摘自 Harbertson 等人 2003, Picciotto 2002)

### 单宁分析

根据 Heredia 等人的方法，将葡萄酒样品在缓冲液 B 中稀释。将 500  $\mu\text{L}$  稀释的葡萄酒样品添加到 1.5 mL 微量离心管中。接着，将 1 mL 具有 BSA (终浓度为 1 mg/mL) 的缓冲液 A 加入到离心管中，并且通过颠倒离心管立即混合试剂。将微量离心管以 13,500 g 离心以沉淀单宁蛋白复合物。从微量离心管中移出上清液，将沉淀重新溶解在 300  $\mu\text{L}$  缓冲液 C 中。将 262  $\mu\text{L}$  等分试样转移至微孔板，并在微孔板读取器中读取 510 nm 的吸光度，缓冲液 C 为空白 (单宁背景测量)。将 38  $\mu\text{L}$  氯化铁试剂添加到每个孔中，使用多通道移液器混合，并在室温下孵育 10 分钟。用缓冲液 C 作为空白在 510 nm 处进行第二次读数 (单宁最终测定)。如表 2 中所述计算每个样品中单宁的量，并以 mg/L 儿茶素当量表示。

### 铁反应性酚类 (IRP) 分析

将 15  $\mu\text{L}$  的未稀释葡萄酒样品添加到微孔板孔中，然后添加 247  $\mu\text{L}$  的缓冲液 C。将试剂用多通道移液器混合。将反应在室温下温育 10 分钟，并用缓冲液 C 作为空白在 510 nm 处读取吸光度 (IRP 背景测量)。随后，将 38  $\mu\text{L}$  氯化铁添加到每个孔中。将试剂用多通道移液器混合。将反应在室温下温育 10 分钟，并使用缓冲液 C 作为空白在 510 nm 处读取吸光度 (IRP 最终测量)。如表 2 中所述计算每个样品中的 IRP 量，并以 mg/L 儿茶素当量表示。

### 花青素分析

根据 Heredia 等人的方法，将葡萄酒样品在缓冲液 B 中稀释。将 500  $\mu\text{L}$  的稀释酒样品添加到 1.5 mL 微量离心管中。接下来，将 1 mL 缓冲液 A 添加至离心管中，并通过倒转离心管立即混合试剂。将 300  $\mu\text{L}$  等分试样一式两份转移至微孔板孔中，并在室温下孵育 10 分钟。以缓冲液 A 为空白在 520 nm 获得测量值 A。

每孔添加 50  $\mu\text{L}$  稀释的葡萄酒样品，然后添加 50  $\mu\text{L}$  缓冲液 B。向该反应混合物中添加 200  $\mu\text{L}$  缓冲液 D 并用多通道移液器混合。将反应在室温下温育 10 分钟，然后测量 520 nm 处的吸光度 (测量值 D)。如表 2 中所述计算每个葡萄酒样品中的花青素含量，并以 mg/L 氯化锦葵色素 3-葡萄糖苷 (M-3-G) 单位表示 (Picciotto, E.A 等)。

Component	Calculations	Factors	x Dilution factor <sup>§</sup>
Tannin	Abs due tannin = $[(\text{Tannin Final} - \text{zero catechin}) / (\text{Tannin Background} * 0.875)]$	x 2	x 5
Sample calculation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tannin Final = 0.50, Tannin Background = 0.05, zero catechin = 0.002, intercept (b) = 0.0075, slope (m) = 0.0053;</li> <li>Abs due tannin = <math>[0.50 - 0.002] - (0.05 * 0.875) = 0.4542</math></li> <li>Tannin = <math>x = (y - b) / m</math> then multiply by factors = <math>[(0.4542 - 0.0075) / 0.0053] * 2 * 5 = 843 \text{ mg/L CE}</math></li> </ul>		
IRP	Abs due IRP = $[(\text{IRP Final} - \text{zero catechin}) / \text{IRP Background} * 0.875]$	n/a	x 20
Sample calculation	<ul style="list-style-type: none"> <li>IRP Final = 0.80, IRP Background = 0.10, zero catechin = 0.002, intercept (b) = 0.0075, slope (m) = 0.0053;</li> <li>Abs due IRP = <math>[0.80 - 0.002] - (0.10 * 0.875) = 0.7105</math></li> <li>IRP = <math>x = (y - b) / m</math> then multiply by dilution factor = <math>[(0.7105 - 0.0075) / 0.0053] * 20 = 2,652 \text{ mg/L CE}</math></li> </ul>		
Anthocyanin	$(\text{Measurement D} - \text{Measurement A}) / \text{factor}$ Multiply D and A by respective dilution factors, where dilution factor for D is twice that of A	divide by 0.0102	D x 10 A x 5
Sample calculation	<ul style="list-style-type: none"> <li>D = 0.4503, A = 0.3800;</li> <li>Anthocyanin = <math>[(0.4503 * 10) - (0.3800 * 5)] / 0.0102 = 255 \text{ mg/L M-3-G}</math></li> </ul>		
LPP	$(\text{Measurement B} - \text{Measurement C}) * \text{factors}$	x 3 x 1.08 x 4/3	x 5
Sample calculation	<ul style="list-style-type: none"> <li>B = 0.2200, C = 0.1200;</li> <li>LPP = <math>[(0.2200 - 0.1200) * 3 * 1.08 * 4/3] * 5 = 2.16 \text{ AU}</math></li> </ul>		
SPP	$(\text{Measurement C}) * \text{factors}$	x 3 x 1.08 x 10/7	x 5
Sample calculation	<ul style="list-style-type: none"> <li>C = 0.1200;</li> <li>SPP = <math>0.1200 * 3 * 1.08 * 10/7 * 5 = 2.78 \text{ AU}</math></li> </ul>		

<sup>a</sup>Abbreviations: CE, catechin equivalent; IRP, Iron-reactive phenolics; M-3-G, malvidin-3-glucoside; LLP, large polymeric pigment; SPP, small polymeric pigment; AU, absorbance unit.

<sup>b</sup>Dilution factor of 5 used for all wines except Pinot noir, for which a factor of 1 was used. Dilution factor of 20 used for all IRP calculations.

<sup>c</sup>Insert "Abs due tannin" (y) into equation of line from catechin standard curve and solve for x, where  $y = mx + b$  and then  $\text{Tannin} = x = (y - b) / m$ .

<sup>d</sup>Insert "Abs due IRP" (y) into equation of line from catechin standard curve and solve for x, where  $y = mx + b$  and then  $\text{IRP} = x = (y - b) / m$ .

表 2 全面红酒酚类物质测定的计算总结 (摘自 Harbertson 等人, 2003; Picciotto 2002)

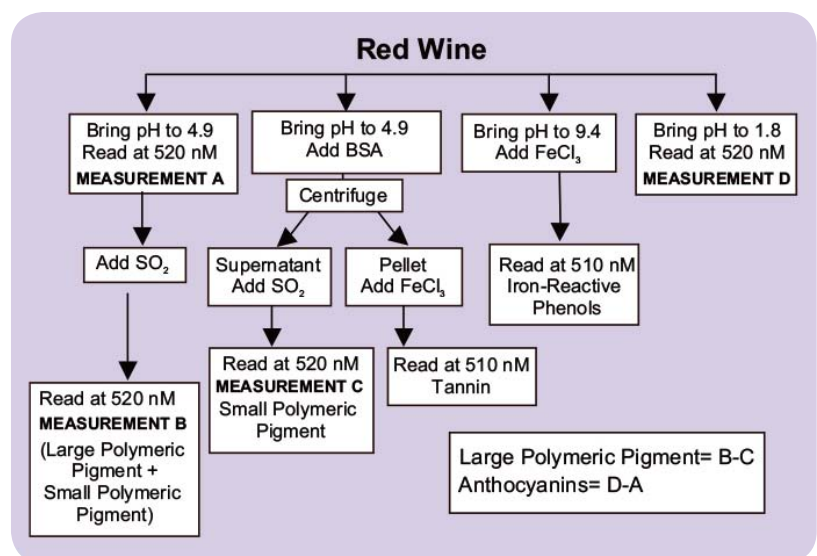


图 3 红酒检测原理

## 仪器设置

仪器通过 SoftMax Pro 软件编程，设置在软件的 plate 部分 (图 4)。

步骤 1. 读取类型为终点法。

步骤 2. 通过在波长选项中键入适当的数字，将波长设置为 510 nm (单宁，儿茶素和铁反应性酚类) 或 520 nm (测量值 A, B, C, D)。

步骤 3. 选择“PathCheck”选项。如果反应在水性环境中进行，则选择“水常数”选项，则软件将使用固件中包含的常数。如果反应在非水环境中进行，则选择比色皿参考选项。在读取过程中，将装有有机缓冲液的比色皿插入比色皿槽中。仪器从比色皿中读取读数，并用它来校正光程。

步骤 4. 不选择自动混匀。

步骤 5. 通过自动校准，仪器会针对所选波长进行自我校准。

步骤 6. 选择适当的平板格式和要读取的孔。

## 模板设置

在软件中设置一个模板，以指示一系列浓度在适当孔中的位置。灵活的模板布局可轻松添加更多样品和重复孔。图 5 是儿茶素标准曲线的模板设置示例。为其他的分析设置了适当的模板。

## 实验结果

### 儿茶素标准曲线

根据实验材料和实验方法制备儿茶素 (0-300 mg/mL) 的标准曲线。SoftMax Pro 软件自动减去空白并计算出平均值，标准偏差和 % CV。该软件还绘制了 510 nm OD 对儿茶素浓度的标准曲线，该曲线用于通过插入计算葡萄酒样品中的单宁和 IRP 浓度。请注意，零儿茶素浓度在分组部分下方的摘要行中被列出 (图 7)。

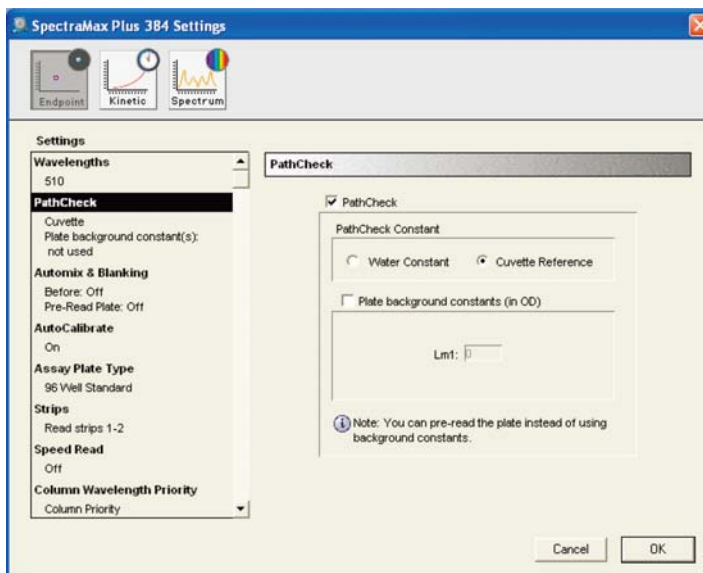


图 4 儿茶素和单宁测定的仪器设置。PathCheck 传感器设置如图所示。如果反应在非水 (有机) 环境中进行，请选择比色杯参考。对于水性反应，选择水常数

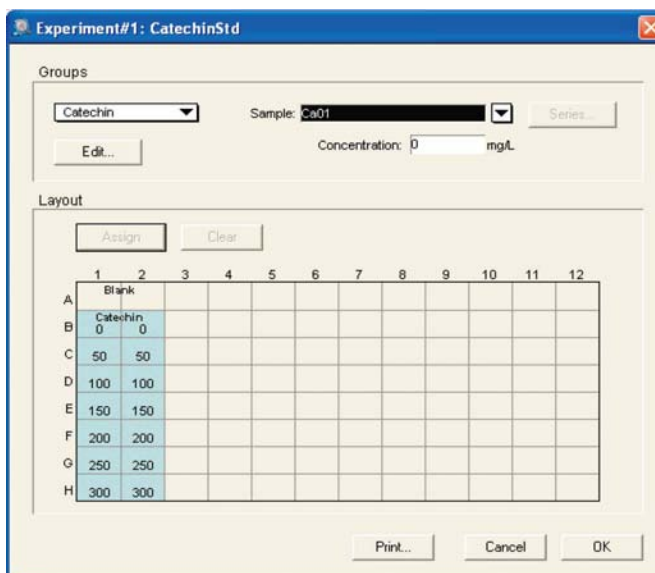


图 5 儿茶素测定的模板设置。RS 分析的模板设置。对于初始板，未设置模板。对于最终的板，分配了空白，标准品和未知样品组

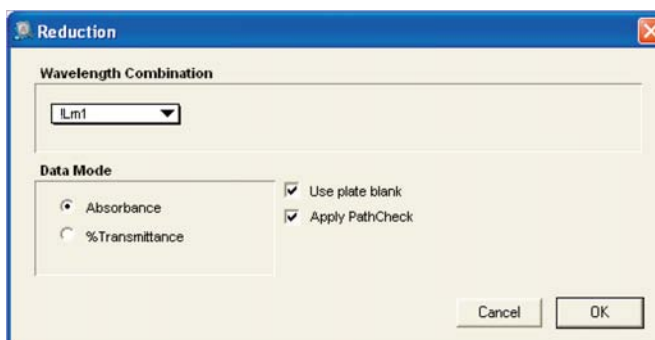


图 6 儿茶素测定的运算设置。运算设置显示自定义公式，该公式用于从最终板中同一孔的光密度中减去初始板中每个孔的光密度。将 PathCheck®Sensor 值应用于计算



### 单宁分析

如实验材料和实验方法中所述进行单宁的分析。通过以下公式对软件进行编程以计算单宁引起的光密度：

$$\text{Abs due to tannin} = \{(\text{Tannin final}) - (\text{Zero catechin})\} - (\text{Tannin background} * 0.875)$$

该软件利用了几茶素分组部分摘要行中的儿茶素浓度为零的 OD。在应用校正因子考虑反应稀释度和葡萄酒稀释度后，通过儿茶素标准曲线的插入计算单宁浓度。在此示例中，未使用稀释因子，因为葡萄酒未稀释 (图 8)。

### 铁反应性酚类(IRP)分析

如实验材料和实验方法中所述进行 IRP 的分析。通过以下公式对软件进行编程以计算 IRP 引起的光密度：

$$\text{Abs due to IRP} = \{(\text{IRP final}) - (\text{Zero catechin})\} - (\text{IRP background} * 0.875)$$

该软件使用了几茶素分组部分摘要行中儿茶素浓度为零的 OD。应用校正因子考虑葡萄酒的稀释度后，通过儿茶素标准曲线的插入来计算 IRP 浓度 (图 9)。

### 花青素分析

如实验材料和实验方法中所述进行花青素的分析。通过以下公式对软件进行编程以计算花青素的浓度：

$$((\text{Measurement D} * 10) - (\text{Measurement A} * 5)) / 0.0102$$

此处，数字 10 和 5 代表各自的稀释因子，而 0.0102 是表示以氯化锦葵色素 3-葡萄糖苷 (M-3-G) 单位表示花青素浓度所需的转化因子 (Picciotto, E.A 等) (图 10)。

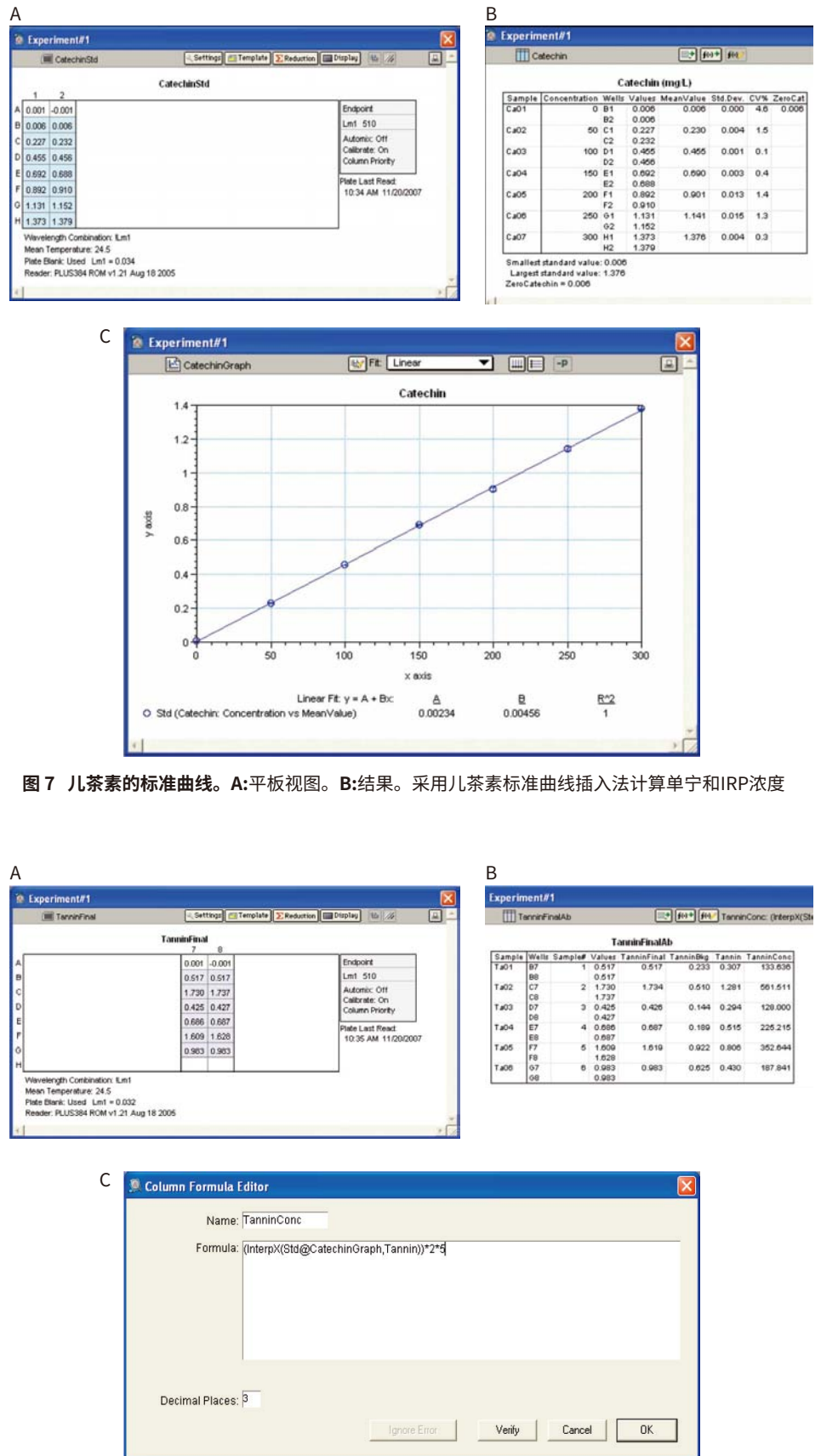


图 7 儿茶素的标准曲线。A:平板视图。B:结果。采用儿茶素标准曲线插入法计算单宁和IRP浓度

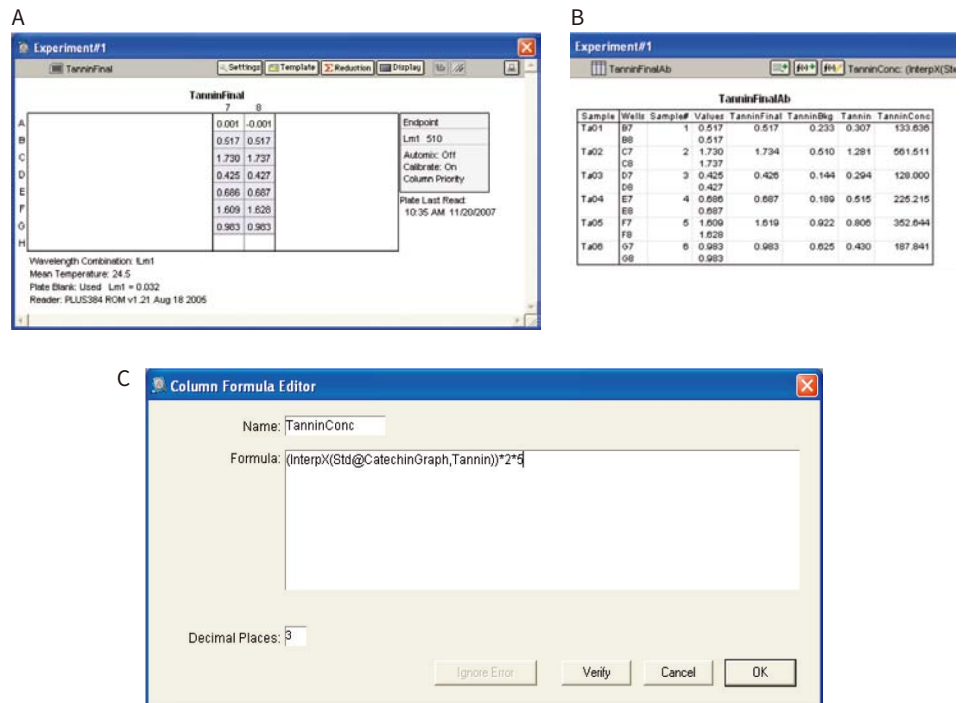


图 8 丹宁的分析。A:平板视图。B:结果。利用儿茶素标准曲线插值 OD 值，得到单宁浓度，自定义公式如图所示

## 结论

- SpectraMax Plus 384 微孔板读板机是在 96 孔板中进行 Heredia 等人描述的红酒酚类测定的理想选择。
- 其他具有吸光度检测模式的 Molecular Devices 微孔板读板机, 例如 SpectraMax i3x 多模式微孔板读板机也可用于此应用。
- 使用微孔板形式既节省成本又节约时间。
- SpectraMax Plus 384 微孔板读板机的可调性和 PathCheck 传感器功能有助于实现更高的精度和准确性。
- SoftMax Pro 软件是用于分析和计算复杂和大型数据集的便捷工具。它提供了预先编写的, 随时可用的模板, 自定义公式以及适当的图形选项。
- 为了提高通量要求, Molecular Devices StakMax® 微孔板处理系统与 SpectraMax 读板机集成在一起, 可以自动处理 20、40 或 50 个微孔板。

## 参考资料

1. Harbertson J F et al.; (2002) Am J Enol Vitic 53: 54-59.
2. Harbertson J F et al.; (2003) Am J Enol Vitic 54: 301-306.
3. Harbertson J F et al.; (2004) Am J Enol Vitic 55: 295A.
4. Heredia T M et al.; (2006) Am J Enol Vitic 57: 497-502.
5. Picciotto E A et al.; (2002) Thesis, University of California, Davis.

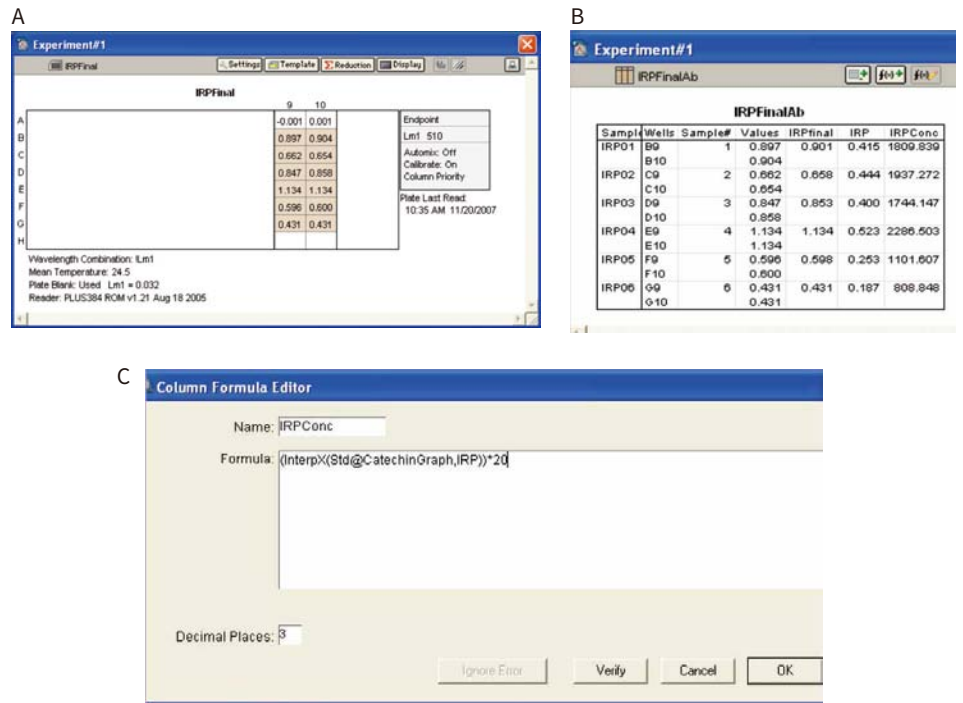


图 9 铁反应性酚类 (IRP)。A: 平板视图。B: 结果。利用儿茶素标准曲线插值 OD 值, 得到 IRP 浓度, 自定义公式如图所示

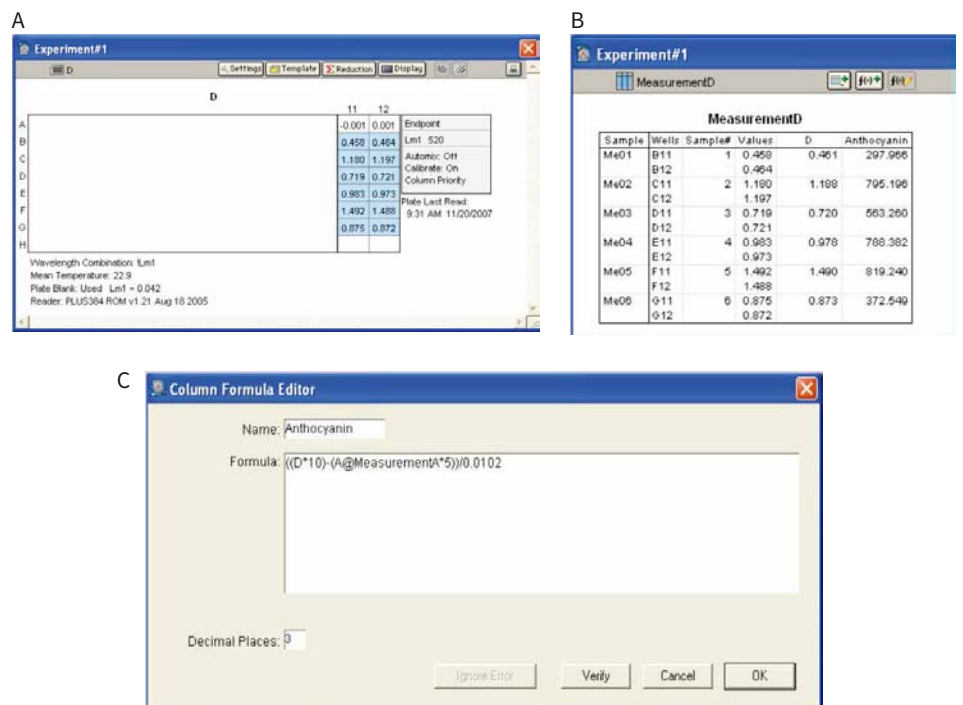


图 10 花青素的分析。A: 平板视图。B: 结果。利用儿茶素标准曲线插值 OD 值, 得到花青素浓度, 自定义公式如图所示



更多精彩内容  
尽在官方微信

## 美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586  
上海 电话: 86-21-3372 1088  
北京 电话: 86-10-6410 8669  
成都 电话: 86-28-6558 8820  
台北 电话: 886-2-2656 7585  
香港

www.MolecularDevices.com.cn  
Email: info.china@moldev.com  
传真: 86-21-3372 1066  
传真: 86-10-6410 8601  
传真: 86-28-6558 8831  
传真: 886-2-2894 8267  
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335  
地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124  
地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016  
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼  
地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

